

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

Optimisation par plan d'expérience, mise au point et validation analytique d'une méthode de dosage simultanée des deux conservateurs antimicrobiens méthyle et propyle parabène après extraction liquide –liquide, selon le protocole SFSTP 2006

Présenté par : M^{elle} TELLAL Sakina et M^{elle} TOULAIT Thinhinane

Soutenu publiquement, le 11 / 07 / 2018, devant le Jury composé de :

<i>HIKEM-OUKACHA Djamila</i>	<i>MCA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>PRESIDENTE</i>
<i>MAMOU Marzouk</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>	<i>ENCADREUR</i>
<i>BOURSOUTI Mourad</i>	<i>pharmacien Résident</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Co-ENCADREUR</i>
<i>BELMAHDI Lila</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>	<i>EXAMINATRICE</i>

Remerciements

*Avant tout propos, nous remercions **DIEU** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la volonté pour mener à ce travail.*

*Nous adressons nos remerciements les plus chaleureux au **Docteur MAMOU .M** professeur en chimie analytique*

Nous vous remercions vivement d'avoir accepté d'encadrer notre travail, et d'assurer l'accessibilité et la disponibilité à l'ensemble de matériel utilisés dans notre travail. C'est avec un immense honneur et un grand privilège de travailler sous votre direction.

Nous rendons hommage à votre sérieux, humanisme, dynamisme et à votre haute compétence.

*Nous remercions aussi chaleureusement **Docteur BOURSOUTI. M** notre Co-promoteur Résident en chimie analytique.*

Nous tenons de vous exprimer notre profonde gratitude pour ton soutien physique, moral, ton sérieux, ta disponibilité ta précieuse aide et ta large contribution qui nous a permis d'accomplir notre travail. Nous sommes aussi très heureux de l'honneur que vous nous avez fait en nous guidant, nous conciliant et en nous consacrant une grande partie de votre temps précieux.

Nous tenons à exprimer notre grand respect et notre gratitude à notre chère Professeur

M^{me} Ayati Fadila

Pour pour ses conseils précieux et son soutien moral

Nous adressons nos remerciements les plus sincères à

M^{me} HIKEM-OUKACHA. D

Qui nous a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et de présider ce jury. Trouvez ici Madame, l'expression de notre profonde reconnaissance.

*Toute notre gratitude à **M^{me} BELMAHDI.L** et, de nous avoir fait l'honneur de participer à ce jury.*

*Nous tenons aussi à remercier toutes les personnes qui ont participé à notre encadrement notamment **Docteur TOUBAL. L** et **Docteur AKLI.K**, et toute l'équipe du laboratoire de chimie analytique.*

Dédicaces

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail

A ma très chère mère, à qui je dois tout dans la vie, celle qui m'a élevé et inculquer les bonnes valeurs de la vie, celle que tous les mots ne suffisent pour lui exprimer mon amour et ma gratitude, je lui souhaite une longue vie, santé, tranquillité, et bonheur inchallah. J'espère que jamais je ne la décevrais et que dieu m'aide à lui rendre au moins un peu de ce qu'elle m'a donné.

A mon défunt père décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. J'espère que, du monde qui est sein maintenant, il appréciera cet humble geste comme preuve de reconnaissance et d'amour de la part de sa famille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse dieu, le tout puissant l'avoir en sa sainte miséricorde.

A mon très cher frère Iddir et ma très chère sœur Katia

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mes anges gardiens et mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mon très cher fiancé Rabah

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis notre rencontre.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

*A Mon très cher binôme Thinhinane, ainsi qu'à toute sa famille
A Mes amis surtout kamília*

SAKINA

Dédicaces

A l'aide de DIEU tout puissant, qui trace le chemin de ma vie, On a pu arriver à réaliser ce modeste travail.

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes qu'elles ne sauraient exprimer la gratitude ni montrer le degré et d'affection que l'on porte aux parents : En ce jour mémorable, je dédie ce travail :

A mon père ;

Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

A ma mère ;

Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection depuis le plus jeune âge, Tu n'as cessé de me soutenir et m'encourager durant mon cursus, tu as toujours été présente à mes côtés.

A mon très chère frère slimane et mes sœurs Katia et Aya ;

A ma grand-mère Tassadit que j'estime beaucoup ;

A mes tantes Fadhila et Saliha ;

A mes chères oncles ;

A la mémoire de ma tante Fadhma et mes grand-parents qu'ils reposent en paix ;

A mon binome Sakina et sa famille ;

A Kamilia et Taous et tous mes amis (es) ;

Thinhinane

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Etude Bibliographique	
1. Conservateurs antimicrobiens dans les sirops	3
1.1. Sirop à base d'alpha-amylase	3
1.2. Principaux conservateurs utilisés dans les formulations pharmaceutiques	3
1.2.1. Parabène	3
1.2.1.1. Propriétés physico-chimiques	5
2. Plan d'expériences	5
2.1. Définition d'un plan d'expérience	5
2.2. Plans de surface de réponse	5
2.2.1. Plan factoriel complet 2^K	6
2.2.2. Plans composite centré	6
2.3. Optimisation	6
3. Extraction liquide-liquide	6
3.1. Principe de l'extraction liquide-liquide	6
3.2. Critères de choix du solvant d'extraction et le diluant	7
3.2.1. Choix de l'extractant	7
3.2.2. Choix de diluant	7
4. Validation analytique	7
4.1. Définition et objectifs de la validation	8
4.1.1. Définition de la validation	8
4.1.2. Objectifs de la validation	8
4.2. Critères de validation	8
4.3. Le choix des critères de validation	10
4.4. Protocole de validation	12

Sommaire

Chapitre 2 : Etude Expérimentale

Partie 1 : Matériels et Méthodes

1.1. Matériels	15
1.1.1. Produits chimiques.....	15
1.1.2. Appareillage.....	17
1.1.3. Verreries et autres.....	19
1.2. Méthodes	19
1.2.1. Plan d'expérience.....	18
1.2.1.1. Construction d'un plan d'expérience.....	18
1.2.1.2. Choix du plan d'expérience.....	19
1.2.1.3. Choix des réponses.....	19
1.2.1.4. Choix des facteurs	19
1.2.1.5. Construction du plan composite.....	20
1.2.2. Mode opératoire de l'extraction liquide-liquide.....	22
1.2.2.1 Préparation des solutions tampons	22
1.2.2.2. Extraction liquide-liquide.....	22
1.2.2.3. Traitement de la phase organique globale.....	23
1.2.2.4. Obtention de la solution finale à analyser.....	24
1.2.3. Méthodologie de la validation analytique	24
1.2.3.1.. Choix du protocole de validation	24
1.2.3.2. Choix des paramètres de validation.....	24
1.2.3.3. Préparations des solutions	24
1.2.3.3.1. Préparation du diluant.....	24
1.2.3.3.2. Préparation du placebo	24
1.2.3.3.3. Préparation de la solution d'étalonnage	24
1.2.3.3.4. Solutions des standards de validation	25
1.2.3.3.5. Préparation de la phase mobile	26
1.2.3.4. Conditions chromatographiques.....	26

Sommaire

Partie 2 : Résultats et discussions

1. Etudes statistiques des résultats de plan d'expérience.....	27
1.1. Plan composite centré	27
1.1.1. Validation du modèle	27
1.1.1.1. Adéquation du modèle	28
1.1.1.2. Facteurs significatifs	29
1.1.1.3. Analyse de la variance.....	30
1.1.1.4. Etude de résidus.....	31
1.1.2. Modélisation des réponses à l'aide du logiciel Modde 6.....	33
1.1.2.1. Modélisation de l'aire du pic du PHBM	33
1.1.2.2. Modélisation de l'aire du pic du PHBP	34
1.1.3. Phase d'optimisation.....	35
2 .Etude statistique des résultats de validation	36
2.1. Résultats.....	36
2.1.1. Spécificité et effet matrice	36
2.1.1.1. Par comparaison des chromatogrammes	36
2.1.1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	38
2.1.1.3. Vérification d'erreurs systématiques	46
2.1.2. Fonction de réponse.....	47
2.1.2.1. Critères de choix de la fonction de réponse.....	49
2.1.3. Alignement des observations.....	52
2.1.4. Prédiction inverse.....	54
2.1.5. Justesse.....	56
2.1.6. Calcul de la fidélité	58
2.1.7. Exactitude	59
2.1.8. Calcul des limites de tolérance	60
2.1.9. Profil d'exactitude.....	61

Sommaire

2.1.10. Linéarité de la justesse.....	62
2.2. Discussions.....	65
2.2.1. Spécificité.....	65
2.2.1.1. Comparaison des chromatogrammes.....	65
2.2.1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	66
2.2.2. Choix de la fonction de réponse.....	67
2.2.3. Profil d'exactitude.....	67
2.2.4. Intervalle de dosage.....	67
2.2.5. Fidélité.....	68
2.2.6. Critères de décision sur la validité de la méthode.....	68
2.2.6.1. Erreur totale.....	68
2.2.6.2. Linéarité de la justesse.....	68
Conclusion générale.....	69

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Description générale sur les parabènes.....	4
Figure 1.2 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. SE : standard d'étalonnage. SV: standard de validation.....	13
Figure 2.1 : Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour l'aire de pic du PHBM.....	30
Figure 2.2 : Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour l'aire du pic du PHBP	31
Figure 2.3 : Histogramme de l'influence des coefficients sur l'aire de pic du PHBM.....	31
Figure 2.4 : Histogramme de l'influence des coefficients sur l'aire du pic du PHBP	32
Figure 2.5: Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour l'aire de pic du PHBM.....	32
Figure 2.6 : Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour l'aire du pic du PHBP	34
Figure 2.7 : valeurs de R^2 , Q^2 , validité du modèle et la reproductibilité en fonction des réponses.....	35
Figure 2.8 : Courbe iso-réponse de l'aire du pic du PHBM en fonction du pH et du volume de la phase aqueuse.....	35
Figure 2.9 : Courbe iso-réponse de l'aire du pic du PHBP en fonction du pH et du volume de la phase aqueuse	37
Figure 2.10 : Chromatogramme du diluant non chargé du PHBM et PHBP	39
Figure 2.11 : Chromatogramme du placebo non chargé de PHBM et PHBP	39
Figure 2.12: Chromatogramme du standard chargé du PHBM et PHBP, niveau 100%	39
Figure 2.13 : Courbes d'étalonnage obtenues pour les SE et SV des trois séries pour le PHBM.....	41
Figure 2.14 : Courbes d'étalonnage obtenues pour les SE et SV des trois séries pour le PHBP.....	41
Figure 2.15 : Superposition des courbes d'étalonnage et de validation de PHBM.....	47
Figure 2.16 : superposition des courbes d'étalonnage et de validation de PHBP	48
Figure 2.17 : Profil d'exactitude pour la fonction logarithmique du PHBM.....	63
Figure 2.18: Profil d'exactitude pour la fonction logarithmique pour le PHBP	63
Figure 2.19 : Courbe linéarité de la méthode pour le PHBM	65

Figure 2.20 : Courbe linéarité de la méthode pour le PHBP	66
Figure2.21 : Schéma d'une chaine d'HPLC	ANNEXE 5
Figure 2.22: Polarités de quelques phases stationnaires	ANNEXE 5
Figure 2.23 : Table de Student	ANNEXE6

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Noms et formules chimiques des principales molécules de la famille des parabènes	4
Tableau 1.2 : Caractéristiques physico-chimiques des parabènes	5
Tableau 1.3: Principaux critères de validation	9
Tableau 1.4 : critères de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitative	11
Tableau 1.5 : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.....	14
Tableau 2. 1 : Liste des produits chimiques utilisés	15
Tableau 2.2 : Appareillage du laboratoire chimie analytique utilisés	17
Tableau 2.3 : Verreries et autres matériels utilisés dans ce présent travail.....	18
Tableau 2.4 : Facteurs étudiés avec leurs niveaux pour le plan composite centré.....	20
Tableau 2.5 : Plan d'expérience en valeurs réelles	21
Tableau 2.6 : Préparation des solutions des standards d'étalonnage	25
Tableau 2.7 : Préparation des solutions des SE	26
Tableau 2.8 : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.....	28
Tableau 2.9 : Matrice du plan composite centré et les réponses enregistrées.....	29
Tableau 2.10 : Analyse de la variance pour l'aire du pic du PHBM	33
Tableau 2.11: Analyse de la variance pour l'aire du pic du PHBP	33
Tableau 2.12 : conditions souhaitées pour l'extraction optimale	37
Tableau2.13 : Solution fournie par l'optimiseur du logiciel Modde 6.....	38
Tableau 2.14: Résultats de la superposition des quatre chromatogrammes	40
Tableau2.15 : Résultats obtenus à partir de la gamme sans matrice pour la PHBM	43
Tableau 2.16: Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de la gamme sans matrice pour La PHBM.....	43
Tableau 2.17: Résultats obtenus à partir de la gamme avec matrice pour le PHBM.....	44
Tableau 2.18 : Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de gamme avec matrice pour la PHBM	45
Tableau 2.19 : comparaison des pentes par le test de STUDENT pour le PHBM	45

Tableau 2.20 : Résultats obtenus à partir de la gamme sans matrice de le PHBP	46
Tableau 2.21 : Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de la gamme sans matrice De PHBP.....	46
Tableau 2.22 : Résultats obtenus à partir de la gamme avec matrice de PHBP	47
Tableau2.23 : Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de gamme avec matrice pour le PHBP	48
Tableau 2.24 : comparaison des pentes par le test de STUDENT pour PHBP	48
Tableau2.25 : Comparaison des deux pentes SE et SV pour PHBM	49
Tableau 2.26 : Vérification des erreurs systématiques par le test de STUDENT de PHBM.....	49
Tableau 2.27 : comparaison des deux pentes SE et SV pour PHBP	50
Tableau 2.28 : Vérification des erreurs systématiques par le test de Student de PHBP	50
Tableau 2.29 : Résultats obtenus pour la fonction $Ln y = f(Ln x)$ pour PHBM	51
Tableau 2.30 : Résultats obtenus pour la fonction $Ln y = f(Ln x)$ pour PHBP	52
Tableau2.31 : Critères de choix de la fonction de réponse pour PHBM	53
Tableau 2.32 : Critères de choix de la fonction de réponse pour PHBP.....	55
Tableau2.33 : Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation pour PHBM.....	56
Tableau2.34 : Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation de PHBP.	57
Tableau 2.35 : Prédiction inverses obtenus à partir des SV de PHBM.....	58
Tableau 2.36 : Prédiction inverses obtenus à partir des SV de PHBP	59
Tableau 2.37 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le PHBM	60
Tableau 2.38 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des SV pour le PHBP	60
Tableau 2.39 : Calcul de fidélité en écarts types relativisés pour le PHBM	61
Tableau 2.40 : Calcul de fidélité en coefficients de variations pour le PHBM	61
Tableau 2.41 : Calcul de fidélité en écarts types relativisés pour le PHBP	61
Tableau 2.42 : Calcul de fidélité en coefficients de variations pour le PHBP	62

Tableau 2.43: Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le PHBM	63
Tableau 2.44: Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le PHBP	63
Tableau 2.45: Calcul des limites de tolérance pour le PHBM.....	64
Tableau 2.46 : Calcul des limites de tolérance pour le PHBP	65
Tableau 2.47 : Vérification de la linéarité de la méthode pour le PHBM.....	66
Tableau 2.48 : Vérification de la linéarité de la méthode pour le PHBP	67
Tableau 2.49 : Données de la droite de linéarité de justesse pour le PHBM.....	67
Tableau 2.50 : Données de la droite de linéarité de la justesse pour le PHBP	68
Tableau 2.51 : Comparaison de la pente à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de Student pour le PHBM.....	68
Tableau 2.52 : Comparaison de la pente à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de Student pour le PHBP	69
Tableau2.53 : Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec 0 pour le PHBM	69
Tableau 2.54 : Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec 0 pour le PHBP	69
Tableau 2.55 : Exemple de fonctions de réponse.....	ANNEXE 3
Tableau 2.56 : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses	ANNEXE 3
Tableau 2.57 : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse	ANNEXE3
Tableau 2.58 : Table de F-critique.....	ANNEXE 6

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

APHB : acide para-hydroxybenzoïque

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

BuP : Butylparabène

BzP : Benzylparabène

Diéthyl-E : Diéthyl-éther

EtP : éthylparabène

Fcrit : F critique

Fobs : F observé

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

I-BuP: Isobutylparabène

ICH: International Conference of Harmonization

I-PrP: Isopropylparabène

ISO: International Standard Organisation

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LD : Limite de Détection

LQ : Limite de Quantification

LQ_{inf} : Limite de Quantification inférieure

LQ_{sup} : Limite de Quantification supérieure

m_{int} : Masse introduite

MeP : Methylparabène

MET : Méthanol

MSE: Mean Squared Error

MSM: Mean Square Model

N° Exp: Numéro d'expérience

Ord : Ordonnée

PA : Principe Actif

pH : Potentiel d'hydrogène

PHBM : Parahydroxybenzoate de méthyle

PHBP : Parahydroxybenzoate de propyle

PrP : Propylparabène

SE : Standard d'Étalonnage

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

Solv : Solvant

SV : Standard de Validation

Vol aq : Volume de la phase aqueuse

[] : Concentration

DEFINITION DE QUELQUES PARAMETRES STATISTIQUES

Biais : Différence entre l'espérance de résultats d'essai et une valeur acceptée comme référence.

Coefficient de corrélation : Quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écarts types.

Coefficient de variation : Pour un caractère positif, il s'exprime par le rapport de l'écart type à la moyenne. Dans la plupart des cas, il est donné en pourcentage.

Ecart type : L'écart type se définit comme étant la racine carré de la variance.

Erreur totale : Somme algébrique de l'erreur due à l'inexactitude et de l'erreur due à l'imprécision

Pente : Angle que fait une droite sur un graphe par rapport à l'horizontale. Il est exprimé sous forme d'un rapport entre les valeurs d'Y et celle de X.

Risque α : Probabilité de rejeter une hypothèse vraie à l'issue d'un test statistique.

Seuil de détection : C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifié comme une valeur exacte

Seuil de quantification : C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies

Test de Student : Les tests de Student sont utilisés dans le cadre des tests relatifs à la moyenne des échantillons de petite taille. Dans le cas où les échantillons sont de grande taille ($n > 30$), on utilise souvent des approximations par des lois normales.

Variance : La variance est un paramètre statistique mesurant la dispersion des individus autour de la Moyenne.

Glossaire

Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques SFSTP

La SFSTP (société française des sciences et techniques pharmaceutiques) est une association des industries de la santé, créé en 1946, elle rassemble les connaissances des industries et de l'université, et contribue à la progression des sciences et techniques pharmaceutiques. La SFSTP publie son travail dans sa revue « Sciences et techniques pharmaceutiques » depuis 1970.

En 1992, la SFSTP publie son article destiné à permettre la validation de procédure analytique en vue d'un dépôt de dossier d'AMM (autorisation de mise sur le marché). Les critères de validation sont : justesse, fidélité et linéarité.

A partir de 2003, La SFSTP publie de nouveaux articles proposant une alternative à la méthode classique de validation de méthodes de dosage. [43]

Bonnes pratiques de fabrication de médicament

Les bonnes pratiques de fabrication (BPF, en anglais Good Manufacturing Practices ou GMP) est une notion d'assurance de la qualité .Etablie par des Etats ou la commission européenne dans le cadre du développement des « démarches qualité », les BPF sont la traduction française de Good Manufacturing Practice ou GMP et s'appliquent à la fabrication de médicament à usage humain ou vétérinaire. [43]

Les BPF représentent donc un ensemble de textes réglementaires qui doivent permettre d'assurer, dans les meilleures conditions de faisabilité, la qualité d'un produit donné. Il existe un texte européen des BPF qui constitue une référence dans les pays de l'Union européenne.

Conférence international d'harmonisation

L'ICH est un comité créé à l'initiative de la communauté économique européenne et fonctionnant sous formes de conférences en vue d'harmoniser les exigences en matière d'AMM entre les Etats-Unis, le Japon et l'Union Européenne. Le rôle de l'ICH est de travailler à l'harmonisation des principes de qualité, sécurité et l'efficacité des médicaments. [44]

ISO/CEI 17025

C'est une norme internationale qui spécifie les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Colorants

Les colorants sont des substances chimiques permettant d'augmenter l'acceptabilité et l'attrance esthétique de la formulation.

Aromatisants

Les arômes sont, dans le domaine pharmaceutique, des produits ou des substances destinées à être introduits dans certains médicaments pour en masquer ou en améliorer la saveur ou l'odeur.

Placebo

C'est substance sans efficacité pharmacologique mais dont l'effet psychologique peut, chez certains malades, jouer un rôle.

Organisation internationale de normalisation (ISO)

Créée en 1947, cette organisation gouvernementales à pour mission principale de promouvoir le développement de la normalisation au niveau international en vue de faciliter les échanges de biens et de services entre les nations et développer la coopération dans les domaines intellectuels, scientifiques et économiques. [44]

Pour atteindre ses objectifs, l'ISO élabore des normes, Ainsi, la norme ISO pour l'assurance de la qualité en contrôle et essais finals est nommée : norme ISO 9003 ; version 2000. [45]

Étalonnage

Ensemble des opérations établissant dans des conditions spécifiées, la relation entre les valeurs de la grandeur indiquée par un appareil de mesure ou un système de mesure, ou les valeurs représentées par une mesure matérialisée, ou par un matériau de référence, et les valeurs correspondantes de la grandeur réalisées par des étalons.

Blanc

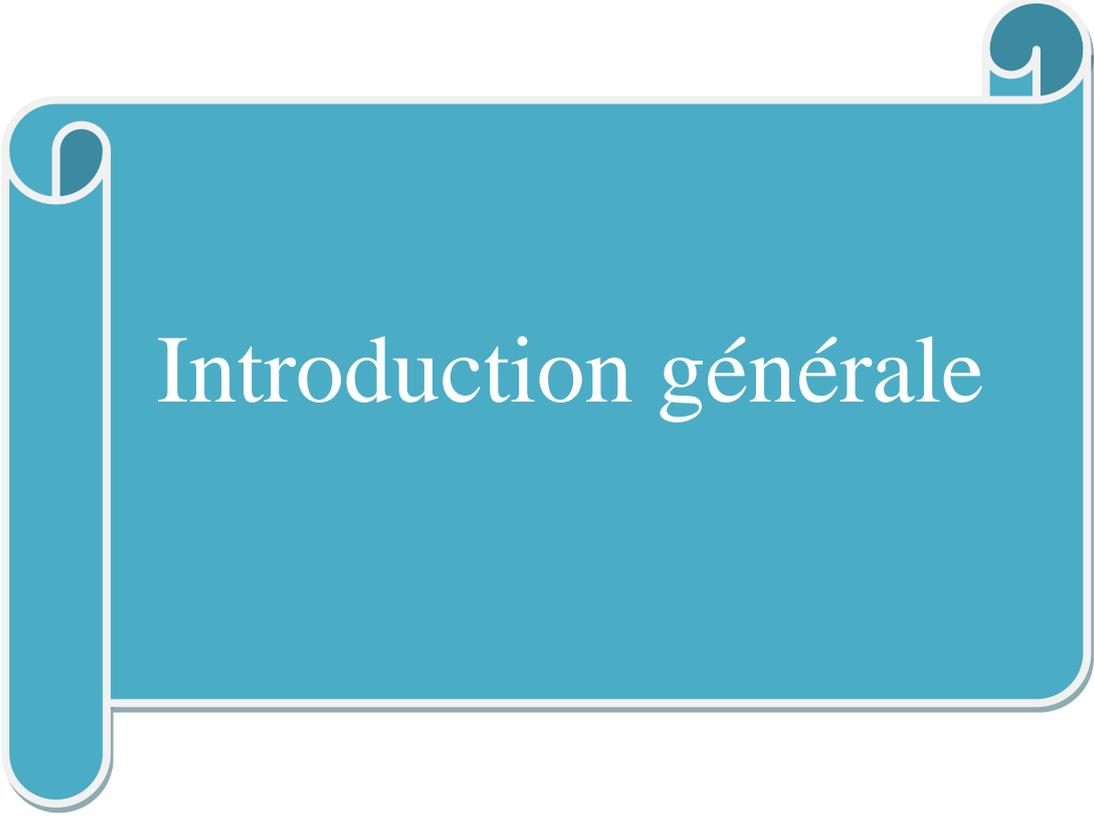
Essai réalisé en l'absence de la matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (blanc matrice). Par extension, la réponse instrumentale en l'absence d'analyte est utilisée (blanc instrumental).

Matrice

Milieu dans lequel se trouve l'analyte.

Série

Ensemble de mesures consécutives effectuées sans interruption et dont les résultats sont obtenus à partir d'une phase unique de calibrage.



Introduction générale

Introduction générale

Le médicament est l'un des produits délicats pour l'homme, sa conception, sa fabrication et sa consommation doivent répondre à des normes strictes, de telle sorte que son utilisation ne doit comporter aucun risque pour les malades [1]. Les préparations liquides pour usage oral nécessitent un ensemble de conservateurs qui constituent aujourd'hui une partie indispensable des produits que nous consommons. Leur usage fait partie de la panoplie des techniques et des moyens qui permettent d'assurer la sécurité du consommateur, d'allonger la durée de vie des produits pharmaceutiques et de limiter leurs altérations par les micro-organismes. [2]

Les conservateurs les plus connus dans l'industrie pharmaceutique sont les parabènes. Leur utilisation dans ce secteur a débuté dans les années 1900. Ils sont inclus dans différents types de produits comme les anesthésiants, les pilules, les sirops ...etc. Depuis quelques années, les parabènes contenus dans les médicaments sont devenus un sujet de nombreuses études scientifiques.

Notre travail s'est focalisé sur l'extraction de ces conservateurs antimicrobiens plus spécifiquement le méthyle et le propyle parabène présents dans un sirop à base d' α -amylase ;pour cela nous avons porté notre attention sur l'extraction liquide -liquide qu'est un procédé qui permet la séparation d'un ou plusieurs constituants d'un mélange en mettant à profit leur distribution inégale entre deux liquides non miscibles.

Nous nous sommes penchés dans un premier temps sur l'optimisation de ce procédé qui s'impose plus que nécessaire, par l'utilisation de l'approche mathématique, dans le but de minimiser le nombre des essais et de réduire les expériences en utilisant les plans d'expériences. Cette méthode est un ensemble de technique statistique et mathématique de conception des expériences, qui permet de construire un model expérimental et d'évaluer l'effet des facteurs séparément et simultanément tels que le type de solvant d'extraction, l'acidité et la basicité du milieu et le volume prélevé de la phase aqueuse), afin de déterminer le rendement optimal de cette extraction.

Pour s'assurer de la fiabilité de cette méthode, elle doit faire l'objet d'une validation. Cette approche se base sur un ensemble de mesures expérimentales formulées en tests statistiques prouvant ainsi mathématiquement la fiabilité et l'exactitude de la méthode.

Introduction générale

Le choix de la méthode de validation s'est vite porté sur la validation par un profil d'exactitude vu qu'il est basé sur une application directe des principes décrits dans les normes de la série ISO 5725.

En effet notre manuscrit est scindé en deux chapitres. Le premier chapitre porte sur la recherche bibliographique qui traite des généralités sur les conservateurs antimicrobiens dans les sirops, les plans d'expériences, l'extraction liquide-liquide et la validation analytique.

Le second chapitre est subdivisé en deux parties :

- La première partie présente les méthodes, le matériel et les techniques utilisées pour la réalisation des essais d'extraction des deux conservateurs ainsi que les essais réalisés pour l'optimisation en utilisant les plans d'expériences et la validation de la méthode analytique.
- La deuxième partie aborde dans un premier lieu la présentation et l'interprétation des résultats d'analyse des plans d'expériences puis, dans un second lieu, traite les résultats de la validation analytique afin de vérifier ses critères conformément au protocole préétabli.

Enfin, une conclusion générale résume l'ensemble des résultats obtenus.

1. Conservateurs antimicrobiens dans les sirops

1.1. Sirop reconstitué à base d'alpha-amylase

Les sirops sont des préparations aqueuses caractérisées par leur saveur sucrée et leur consistance visqueuse. Ils peuvent contenir du saccharose à une concentration au moins égale à 45 pourcent m/m [1].

A une concentration voisine de 65% en masse (une densité de l'ordre de 1,32 à 20°C), le saccharose assure une protection antimicrobienne. [3]

Ce médicament contient une enzyme destinée à lutter contre l'œdème et l'inflammation. Il est utilisé dans le traitement d'appoint de l'inflammation aiguë de la gorge. Ce traitement se prend par voie orale, conçus généralement pour les enfants à partir de six mois.

Ce sirop contient un principe actif (PA) et aussi des substances auxiliaires telles que les colorants, aromatisants et agents antimicrobiens.

- Principe actif : alpha-amylase, c'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires de type endoglycanases, de la classe des hydrolases, qui agit sur les liaisons α (1-4) de l'amidon [4].
- Excipients : Saccharose, Parahydroxybenzoate de méthyle sodé (E219), parahydroxybenzoate de propyle sodé (E217) (Conservateurs antimicrobiens), Agent colorant azoïque (jaune orangé) (E110) (Colorants) le glycérol, huile essentielle soluble de mandarine (S164) et l'acide citrique monohydraté (aromatisants)

1.2. Principaux conservateurs utilisés dans les formulations pharmaceutiques

1.2.1. Parabènes

Les parabènes ou parahydroxybenzoate, sont des esters de l'acide parahydroxybenzoïque (APHB), dont la compression du mot a donné leur nom courant. [5]

La famille de molécules s'articule autour d'un même squelette chimique. Celui-ci est constitué d'un cycle unique aromatique, d'un groupement hydroxyle et d'un groupement ester en position para du cycle [5]. (Figure 1.1)

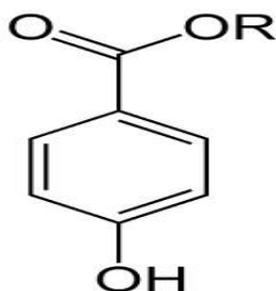


Figure 1.1 : Description générale des parabènes [6]

Les molécules diffèrent entre elles grâce à la longueur de la chaîne alkyle. Leurs noms, ainsi que leurs formules, sont présentés dans le tableau 1.1.

Les parabènes peuvent être classés en deux catégories :

- Les parabènes à chaîne « courte » : Methylparabène (MeP) et éthylparabène (EtP).
- Les parabènes à chaîne « longue » : Propylparabène (PrP), Isopropylparabène (i-PrP), Butylparabène (BuP), Isobutylparabène (i-BuP) et Benzylparabène (BzP).

Tableau 1.1 : Noms et formules chimiques des principales molécules de la famille des parabènes [5]

Nom	Abréviatio n	N° CAS	Formule chimique	Formule développée
Methylparabène\4- hydroxybenzoate de méthyle	MeP	99-76-3	C₈H₈O₃	
Ethylparabène\4- hydroxybenzoate d'éthyle	EtP	120-47-8	C₉H₁₀O₃	
Propylparabène\4- hydroxybenzoate s de propyle	PrP	94-13-3	C₁₀H₁₂O₃	
Butylparabène\4- hydroxybenzoate de butyle	BuP	94-26-8	C₁₁H₁₄O₃	

1.2.1.1. Propriétés physico-chimiques

A l'état pur, les parabènes sont sous la forme d'une poudre cristalline incolore et inodore. Les principales caractéristiques physico-chimiques des parabènes sont présentées dans le tableau 1.2 suivant.

Tableau 1.2 : Caractéristiques physico-chimiques des parabènes [7]

Caractéristiques	MeP	EtP	PrP	BuP
Poids moléculaire (g/mol)	152,15	166,17	180,21	194,23
Point de fusion (°C)	131	117	97	68,5
Point d'ébullition (°C)	275	297,5	285,14	300,26
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	2500	885	500	207
PKa	8,31	8,31	8,23	8,22

2. plan d'expérience

2.1. Définition d'un plan d'expérience

Un plan d'expérience constitue une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manières efficaces et économique. La méthodologie des plans d'expériences est basée sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats. (Norme ISO 3535-3) [8].

2.2. Les plans de surface de réponse

Le plan d'expérience est une techniques qui permet de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse et de les optimiser dans des domaines expérimentaux bien déterminés. Afin de décrire la méthode permettant d'obtenir la réponse optimale une suite d'essais consistant à manipuler les facteurs est organisée. La méthodologie de surface de réponse fait partie du plan d'expérience utilisé pour l'optimisation. C'est une modélisation empirique technique consacrée à l'évaluation de la relation d'un ensemble de facteurs expérimentaux contrôlés et observés avec les résultats [9].

2.2.1. Plans factoriels complets à deux niveaux (2^k)

Ce sont les plus utilisés car les plus simples et les plus rapides à mettre en œuvre. Ils sont notés 2^k où le 2 correspond aux niveaux maximal et minimal qui délimitent le domaine d'étude d'un facteur et k est le nombre de facteurs étudiés. Pour un plan factoriel complet à k facteurs, il va donc falloir mener 2^k expériences. Le principe consiste alors à répartir, de façon optimale, les essais dans le domaine expérimental.

2.2.2. Les plans composites centrés

Utilisés en complément d'un plan factoriel quand le modèle linéaire précédent ne donne pas satisfaction. Le principe est de rechercher les expériences ou les valeurs des facteurs qui permettent de résoudre le modèle mathématique avec un maximum de précision par une fonction polynomiale de second degré.

2.3. Optimisation

L'optimisation consiste à atteindre les spécifications imposées et ce, de façon optimale, en suivant les variables qui correspondent aux paramètres opératoires du système étudié.

Quand un modèle mathématique est construit pour décrire un phénomène, il peut être utilisé pour prédire les réponses dans le domaine d'étude ou pour trouver les conditions expérimentales qui conduisent à la réponse optimale [10].

3. Extraction liquide-liquide

3.1. Principe de l'extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est un procédé qui permet la séparation et la purification d'un ou plusieurs constituants d'un mélange, Cette séparation est basée sur le transfert d'une substance **S** à extraire, d'une solution A (généralement une phase aqueuse) à une solution B non miscible à la première (le plus souvent organique) de masses volumiques différentes [11].

L'extraction liquide-liquide a lieu en deux étapes :

- La première étape consiste à mettre en équilibre les deux phases par agitation et réaliser le passage de **S** d'une phase à l'autre.
- Dans la seconde étape, procéder à la séparation des deux phases par décantation naturelle : la substance **S** est alors isolée dans la phase B [12].

3.2. Critères de choix du solvant d'extraction et le diluant

3.2.1. Choix du solvant d'extraction

Lors de la séparation par extraction liquide-liquide, il est primordial de déterminer le solvant le plus approprié. Ce choix affectera de façon notable la rentabilité du procédé [13]. Le solvant d'extraction doit assurer un compromis entre des caractéristiques physico-chimiques et des aspects technico-économiques :

- Un faible coût et une faible toxicité,
- Le solvant d'extraction doit assurer une bonne sélectivité, [13]
- Le solvant d'extraction doit rester chimiquement et thermiquement stable au cours de l'opération,
- Insolubilité dans la phase aqueuse
- Il ne doit être ni corrosif et ni chimiquement très réactif

3.2.2. Choix de diluant

Les diluants jouent un rôle important au niveau du transfert du soluté entre les phases et notamment agir sur la cinétique d'extraction. [13]

4. validation analytique

L'industrie pharmaceutique est dans le monde entier un élément important dans le système de la santé, son activité et ses produits sont soumis aux lois, et aux règlements qui s'appliquent à la mise au point, à la fabrication, et au contrôle qualité [14].

Dans tous les domaines d'analyse, les méthodes analytiques fiables sont requises pour assurer la conformité avec les réglementations nationales et internationales. Par conséquent, il est reconnu partout dans le monde qu'un laboratoire doit prendre des dispositions appropriées pour garantir qu'il est en mesure de fournir des données du niveau de qualité requis. De telles dispositions comprennent : L'utilisation de méthodes analytiques validées [15].

4.1. Définition et objectifs de la validation

4.1.1. Définition

Selon la norme NF en ISO/ CEI17025, il s'agit de la « confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [16,17].

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 [17].

4.1.2. Objectifs de la validation

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée.

Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de produits pharmaceutiques, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée. Autrement dit : « le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue ».

L'objectif d'une méthode d'analyse est de pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. C'est-à-dire que l'écart du résultat d'analyse et de la valeur vraie inconnue soit inférieur à une limite d'acceptation (λ) qui peut être variable selon les exigences de l'analyste (et/ou du client) et de la finalité de la méthode d'analyse. Il apparaît ainsi deux principes fondamentaux : la notion de limite d'acceptation des performances d'une procédure analytique et celle de la responsabilité de l'analyste dans la décision d'accepter ou non une procédure en fonction de ses performances et de l'usage pour lequel elle est destinée [18].

4.2. Critères de validation

Les principaux critères de validation couramment utilisés dans les laboratoires sont résumés dans le tableau 1.3 suivant:

Tableau 1.3: Principaux critères de validation

Critères	Définitions	
La spécificité ou sélectivité	La propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc. [19].	
La linéarité	La capacité d'une procédure d'analyse 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 [20].	
La justesse d'une méthode	La justesse 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 [21].	
La fidélité	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 [21]:	
	La répétabilité	Exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps; la répétabilité est aussi désignée par: précision intra-analyse [19].
	La fidélité intermédiaire	Exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents... [19].
La reproductibilité	Exprime la fidélité inter-laboratoire [21].	

Exactitude	<p>Exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ».</p> <p>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 [22].</p>
Limite de quantification	<p>La plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie [19].</p>
Robustesse	<p>La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquences de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation[21].</p>

4. 3. Le choix des critères de validation

Les critères de validation des méthodes qualitatives et quantitatives sont résumés dans le tableau 1.4 ci-dessous.

Ces caractéristiques ne doivent pas être systématiquement étudiées et documentées mais l'absence d'une ou plusieurs caractéristiques doit être justifiée dans le rapport de caractérisation et de validation de méthode d'analyse [16].

Tableau 1.4: Critères de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et quantitatives. [16]

Étape du processus de validation	Critères		Critères de performance	
			Qualitative	Quantitative
Caractérisation Intra labo	Spécificité		X	X
	Sensibilité		X	(X) ¹
	Fonction d'étalonnage			X
	Fidélité	Répétabilité	(X)	X
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse		sans objet ²	X
	Exactitude (justesse+fidélité) ³		sans objet	X
	Linéarité		sans objet	X
	Limite de	Quantification	sans objet	(X)
		Détection		
Domaine de validité		sans objet	X	
Caractérisation interlaboratoires	Reproductibilité		X	X
	Répétabilité		(X)	X
	LD		(X)	sans objet
	LQ		sans objet	(X)
	Spécificité ⁴		X	sans objet
	Sensibilité ⁵		X	sans objet
	Autres caractéristiques non techniques à définir selon les points critiques et le cahier des charges (délai, rapidité, efficience, coût...)		X	X

¹Les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées

²Sans objet : caractéristique non pertinente

³Pour les méthodes analytiques quantitatives, l'exactitude représente toujours la combinaison de la justesse et de la fidélité

⁴ou taux de faux positifs dans certains référentiels

⁵ou taux de faux négatifs dans certains référentiels

Les caractéristiques listées dans le tableau 1.4 en amont sont au minimum requises pour une caractérisation complète de la méthode. Toutefois, selon les référentiels applicables au domaine concerné, d'autres caractéristiques pourront être exigées (ex : robustesse, exactitude relative...) [16].

4.4. Protocoles de validation

Le profil d'exactitude ne s'applique qu'aux méthodes complètement développées et mises au point. En particulier, la sélectivité/ spécificité doit avoir été étudiée ainsi que le domaine d'application de la méthode à valider, en termes de types de matrice et de niveaux de concentrations. L'ensemble des données de la phase de validation doit faire l'objet d'un rapport détaillé dans lequel tous les résultats obtenus doivent être documentés. Au terme de la phase de validation et avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé. Selon les référentiels, les principaux objectifs de la phase de validation sont :

- Démontrer la spécificité (sélectivité),
- Valider la fonction de réponse (ou modèle d'étalonnage utilisé en routine),
- Estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire),
- Estimer la justesse,
- Estimer l'exactitude,
- Valider les seuils de quantification,
- Valider l'intervalle de dosage,
- Vérifier la linéarité de la procédure analytique [19].

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode d'analyse on opère sur deux ensembles d'échantillons:

- Standards d'étalonnage (SE): peuvent être réalisés sans la matrice (si on a démontré l'absence d'effet matrice) ou avec la matrice, utilisé pour évaluer les différentes fonctions de réponse $y = f(x)$ afin d'effectuer les prédictions inverses.
- Standards de validation (SV): doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisé 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 inférieures et supérieure de quantification (intervalle de dosage).

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure 1.2 suivante, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de la validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve [19].

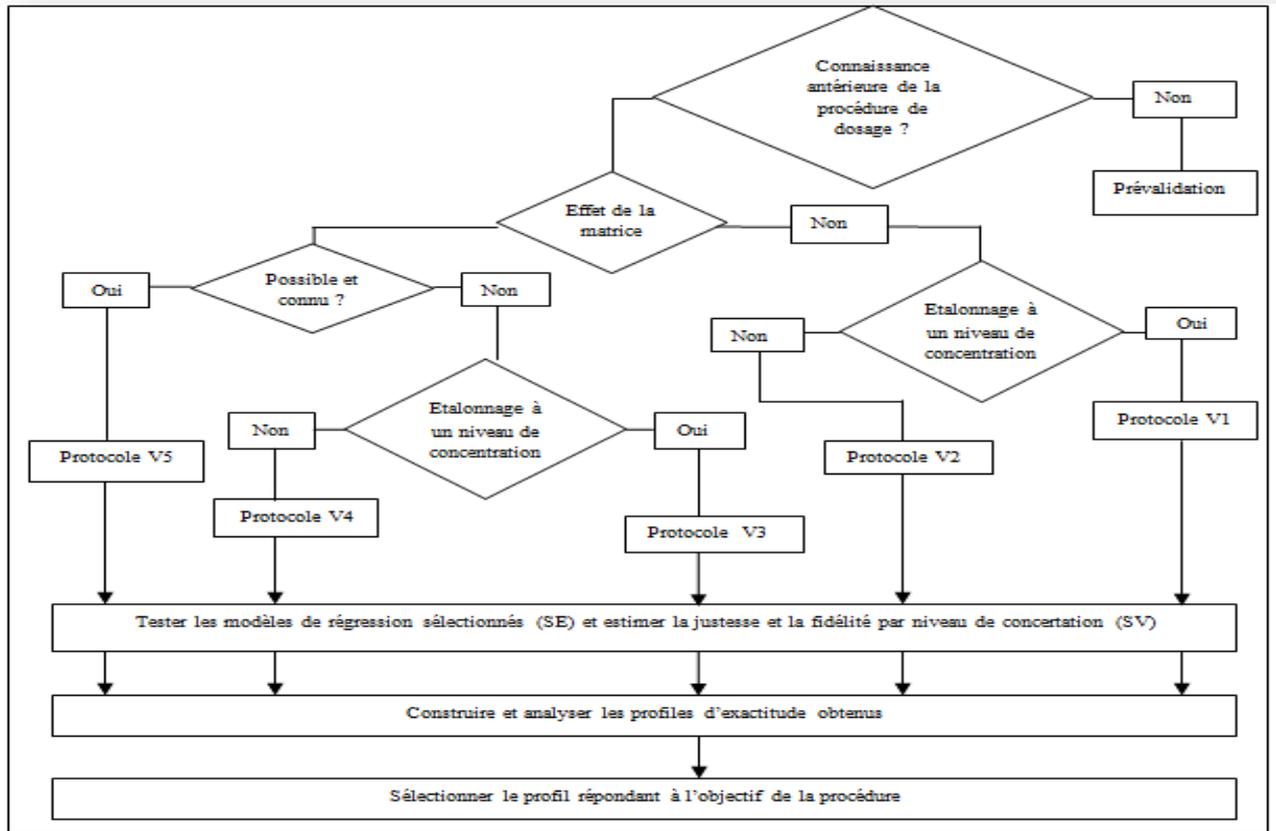


Figure 1.2 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. SE : standard d'étalonnage. SV: standard de validation

Le tableau 1.5 montre selon le protocole choisi, le nombre total minimal d'essai à réaliser pour valider la procédure analytique concernée:

Tableau 1.5 : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	
	Haut	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Haut			2 ⁽¹⁾	2	2
	Additif					2 ⁽³⁾
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre minimum séries		3	3	3	3	3
Nombre total essais (min)		33	45	39	63	45

¹Suppression 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.

²Sélection d'un niveau de concentration supérieure à la concentration cible pour l'étalonnage (exemple : 120% de la concentration cible).

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

L'étude pratique a été réalisée dans le laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et ce dans le but d'optimiser et de valider l'extraction liquide-liquide des conservateurs antimicrobiens méthyle et propyle parabènes à partir d'un sirop reconstitué à base d'alpha- amylase.

Partie 1 : Matériels et méthodes

1.1. Matériels

1.1.1. Produits chimiques

Les produits chimiques et les réactifs utilisés dans le procédé d'extraction liquide-liquide des deux conservateurs antimicrobiens à partir du sirop reconstitué à base d'alpha- amylase sont illustrés dans le tableau 2.1 ci-dessous.

Tableau 2.1 : Liste des produits chimiques utilisés

Produits	Masse molaire (g /mol)	Pureté (%)	Fournisseur
Acide chlorhydrique (Hcl)	36.46	36.5-38	SIGMA-ALDRICH
Sulfate de sodium anhydre(Na ₂ SO ₄)	142.04	≥99	SIGMA-ALDRICH
Méthanol grade HPLC	32.04	99.9	BIOTECH
Hydroxyde de sodium (NaOH)	40	98	BIOTECH
Parahydroxybenzoate de méthyle	152.15	≥99.0	SIGMA-ALDRECH
Parahydroxybenzoate de propyle	180.20	≥99.0	SIGMA-ALDRECH
Sulfate de potassium	136.09	98-100.5	SIGMA-ALDRECH
Ethanol absolue	46.07	99.98	ANALAR NORMAPUR

Glycérol (C ₆ H ₈ O ₃)	92.09	99.0-101.0	SIGMA-ALDRECH
Acide citrique (C ₆ H ₈ O ₇)	192.124	99	SIGMA-ALDRECH
Saccharose(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	342.3		R.P.NORMAPUR
Acide acétique (C ₂ H ₄ O ₂)	60.05	99-100	SIGMA-ALDRECH
Chlorure de sodium (NaCl)	58.44	≥99.5	SIGMA-ALDRECH
Hydroxyde d'ammonium (NH ₄ OH)	35.05	33	SIGMA-ALDRECH
Bicarbonate de sodium	84.01	≥99.0	FLUKA

➤ **Solvants organiques**

• **Ether diéthylique**

L'éther diéthylique, également appelé éther éthylique de formule CH₃-CH₂-O-CH₂-CH₃, est un liquide limpide, incolore et très inflammable avec un point d'ébullition bas et une odeur typique. Il a une masse molaire de 74,12g/mol, une densité de 0,67 (20 °C) et une viscosité de 0,224 mPa.s. Sa température d'ébullition est de 35 °C et il est faiblement soluble dans l'eau.

• **Hexane**

Le *n*-hexane, ou parfois simplement hexane, est un hydrocarbure saturé de la famille des alcanes de formule brute C₆H₁₄. L'hexane est un solvant utilisé en chimie organique (notamment pour les réactions et les extractions). C'est un liquide limpide, incolore avec une température d'ébullition de 68,73 °C, de masse molaire de 86.18g/mol et de masse volumique de 0,6594 g·cm.

1.1.2. Appareillage

Tableau 2.2 : Appareillage du laboratoire chimie analytique utilisés

Désignation		Spécification	Usage
	Colonne	C 18	
Appareil HPLC (SHIMADZU LC20)	Pompe	LC20AT	Analyse des solutions et obtention des chromatogrammes
	Injecteur automatique	SIL 20A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Détecteur	Détecteur spectrophotométrique	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Purificateur d'eau		Human power	Purification de l'eau
Bain ultrasons : sonicateur		Advantage-LAB	Dissolution(solubilisation)
Pompe à vide		Fisher bioblok-scientific Pmax =4 bar	Filtration de la phase mobile
Balance analytique		Kern ALT 220-5 DAM (précision 0.01mg)	Pesée
Etuve		Memmert	Séchage
Vortex		IKA MS3 digital	Agitation
PH- mètre de paillasse		Metler Tolido	Evaluation du pH d'une solution
Agitateur magnétique chauffant		Nahita Model 690-1	Homogénéisation des Solutions
Centrifugeuse		Eba 20	Centrifugation

1.1.3. Verreries et autres

Tableau 2.3 : Verreries et autres matériels utilisés

Verreries	Autres
Béchers ;	Pro pipette ;
Fioles jaugées de 50ml, 100ml, 200ml et 500ml ;	Compte-goutte ;
Entonnoir ;	Pissette à eau distillée ;
Cristallisoir ;	Papier d'aluminium
Tubes coniques ;	Filtres millipores ;
Tubes à essai ;	Barreau magnétique ;
Eprouvettes graduée 100ml ;	Micropipette : 1ml ;
Verre de montre ;	Bavettes ;
Pipettes jaugées de 2ml, 5ml et 10ml	Spatule ;
Vials	Seringue ;
Erlenmeyer	Des flacons pour phase mobile ;
	Gant et masque de sécurité ;
	Portes tubes
	Embout

1. 2. Méthodes

1.2.1. Plan composite centré

1.2.1.1. Construction de plan d'expérience

L'outil mathématique utilisé pour déterminer le nombre d'essai à réaliser pour l'extraction du PHBM et PHBP est le plan d'expérience. Cette méthodologie permet une meilleure planification des essais d'extraction de manière à obtenir le maximum d'informations pour un minimum d'expériences tout en assurant à l'expérimentateur plus de sûreté et de précision sur les résultats attendus. Elle a pour objectif d'optimiser les niveaux de facteurs étudiés pouvant influencer le rendement d'extraction liquide-liquide des deux conservateurs.

La génération de la matrice d'expériences ainsi que l'analyse statistique des résultats ont été faites au moyen du logiciel Modde, version 6 [23].

1.2.1.2. Choix du plan d'expérience

L'objectif étant d'optimiser le rendement d'extraction en variant le pH du milieu d'extraction, le volume de la phase aqueuse et le type de solvant d'extraction. Nous avons choisi un plan de surface du type composite centré car il permet d'étudier les facteurs extérieurs et intérieurs qui influent sur l'extraction.

Ce plan permet d'obtenir une meilleure précision sur la modélisation des résultats, l'étude du mode d'action des facteurs sur les réponses et permet la prédiction et l'optimisation des réponses.

1.2.1.3. Choix de la réponse

La réponse correspond aux aires des pics des deux conservateurs PHBM et PHBP antimicrobiens analysés par HPLC.

1.2.1.4. Choix des facteurs

Le rendement d'extraction dépend de plusieurs facteurs tels le pH du milieu, le type de solvant et le volume de la phase aqueuse.

- Le pH du milieu est l'un des facteurs les plus influents vu que le PHBM et PHBP possèdent chacun une fonction hydroxyle avec un hydrogène mobile et donc un milieu acide qui favorise la molarisation de la molécule et sa migration vers la phase organique.
- Un faible volume de la phase aqueuse avantage la saturation de cette dernière ce qui favorise la migration.
- Le type de solvant est l'un des facteurs qu'influents sur le rendement d'extraction, chaque solvant est caractérisé par son indice de polarité de ce fait sa capacité extractive. Deux solvants ont été choisis avec des indices de polarité de 0,06 et 2,9 pour l'hexane et le diéthyl-éther respectivement.

Le Tableau 2.4 regroupe les niveaux des facteurs étudiés en valeurs codées (-1 désignant le niveau bas, 0 le niveau moyen et 1 le niveau haut) et en valeurs réelles. L'effet d'un facteur est défini comme la variation d'une réponse lorsque ce facteur passe du niveau inférieur (-1) à son niveau supérieur (1).

Tableau 2.4 : Facteurs étudiés avec leurs niveaux pour le plan composite centré

	Facteurs étudiés	Niveau -1	Niveau 0	Niveau +1
X ₁	pH du milieu d'extraction	4	8.5	13
X ₂	Volume de la phase aqueuse (ml)	1	2	3
X ₃	Type de solvant	Hexane		Ether diéthylique

1.2.1.5. Construction du plan composite

Avec un plan composite centré, il est possible de déterminer des surfaces de réponse, ce qui permet de rechercher les réponses optimales et de repérer les valeurs des facteurs étudiés qui conduisent à cet optimum. La méthodologie permet de modéliser les réponses en fonction des facteurs, en vue de prédire le comportement du système dans des conditions opératoires données [24].

Pour notre étude, le nombre de facteurs (k) est égal à 3. le nombre d'essais à réaliser équivaut au nombre d'essais du plan factoriel (N_F=2^K), auquel on ajoute quatre points supplémentaires au centre (N₀) pour évaluer la reproductibilité des mesures et l'erreur expérimentale, et quatre points « axiaux » pour le facteur qualitatif (N_α) et deux points « axiaux » pour les deux facteurs quantitatifs, avec α = 1.

Le nombre total d'essais à réaliser est :

$$N_F + N_0 + N_\alpha = 2^K + 4 + 2*2 + 4*1 = 2^3 + 4 + 4 + 4 = 20 \quad (1)$$

La réponse étudiée en fonction des facteurs expérimentaux est donnée par l'équation (2) suivante qui est une équation du second ordre de la forme:

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 \quad (2)$$

x₁, x₂, et x₃ : les niveaux des facteurs 1, 2, 3

a_{ij} : sont les coefficients du modèle. Avec i = 0, 1, 2,3 et j = 1, 2,3

La matrice d'expériences correspondant aux valeurs réelles des facteurs influençant l'extraction du PHBM et PHBP, obtenue par le logiciel, est donnée dans le tableau 2.5

Tableau 2.5 : plan d'expérience en valeurs réelles

N° D'EXP	Ph	Vol aq (ml)	Type de solvant
1	4	1	Hexane
2	13	1	Hexane
3	4	3	Hexane
4	13	3	Hexane
5	4	2	Hexane
6	13	2	Hexane
7	8.5	1	Hexane
8	8.5	3	Hexane
9	4	1	Ether diéthylique
10	13	1	Ether diéthylique
11	4	3	Ether diéthylique
12	13	3	Ether diéthylique
13	4	2	Ether diéthylique
14	13	2	Ether diéthylique
15	8.5	1	Ether diéthylique
16	8.5	3	Ether diéthylique
17	8.5	2	Hexane
18	8.5	2	Ether diéthylique
19	8.5	2	Ether diéthylique
20	8.5	2	Ether diéthylique

1.2.2. Mode opératoire de l'extraction liquide-liquide

1.2.2.1. Préparation des solutions tampons

- **Tampon Acétate de sodium (pH=4)**

Le tampon Acétate de sodium a été obtenu comme suit :

-Dans une fiole de 100mL, verser un volume de 15 ml d'acide acétique, compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

-Dans une fiole de 50 ml, peser 2g de NaOH, dissoudre dans un volume suffisant d'eau purifiée. Agiter et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

-Ajuster le pH jusqu'au 4 ± 0.05 par la solution de NaOH. [1]

- **Tampon bicarbonate (pH=8.5)**

Dans une fiole de 100mL, peser 0.84g de NaHCO_3 , compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée après l'avoir mis dans l'ultrason pendant 2 mn avec une proportion d'eau qui permet une solubilisation. Ajuster le pH à 8.5 avec la même base. [1]

- **Milieu ammoniacale (pH=13)**

Dans une fiole de 100mL, mettez un volume $V = 35$ ml d'ammoniaque concentrée, compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée après l'avoir mis dans l'ultrason pendant 2 mn. Ajuster le pH à 13 avec une solution d'hydroxyde de sodium concentré à l'aide d'un pH-mètre avec une solution d'hydroxyde de sodium concentré comme la figure 2.1 ci-dessous le montre.

1.2.2.2. Extraction liquide-liquide

Les expériences sont réalisées dans des tubes coniques de 10 ml auxquels nous avons introduit une masse de 400 mg de chlorure de sodium.

Ajouter un volume de 2ml de solution aqueuse (solution fille), 1 ml de la solution tampon (pH=4), et un volume de 4 ml de la phase organique (Ether diéthylique).

Les deux phases ainsi introduites sont par la suite agitées à l'aide d'un agitateur vortex IKA MS3 digital avec une fréquence d'agitation de 400 tours. min^{-1} . Le temps d'agitation a été fixé à 1 min.

Toutes les expériences sont réalisées à une température ambiante (température du laboratoire).

Après un temps suffisant de décantation (obtention de deux phases claires avec une interface distincte après 10 min), les deux phases sont séparées.

Retirer la phase organique à l'aide d'une seringue dans des tubes à essais de 15 ml et la conserver.

Répéter l'opération une autre fois en utilisant une phase organique neuve (4 ml).

1.2.2.3. Traitement de la phase organique globale (les deux extraits réunis)

- **Séchage des extraits**

Les traces d'eau de la phase organique globale sont éliminées par contact entre cette dernière et 30 mg de sulfate de sodium anhydre (SO_4Na_2) pendant 2 mn, puis mettre les tubes dans l'étuve après élimination du sulfate de sodium par centrifugation.

1.2.2.4. Obtention de la solution finale à analyser

Le filtrat est recueilli dans un récipient approprié et évaporé à sec dans l'étuve.

Le résidu d'évaporation est repris par 2 ml de méthanol.

Récupérer la solution dans des Vials contenant les excipients recherchés (extraits) qui seront soumis à l'analyse par HPLC.

1.2.3. Méthodologie de la validation analytique

Inspiré des travaux d'une commission de la SFSTP (SFSTP 2003 et 2006), ce nouveau protocole de validation se veut plus réaliste que les protocoles de validation avec critères, en essayant de garantir la qualité des résultats ultérieurs avec un risque connu prédéfini en fonction de la finalité de la méthode d'analyse à valider.

1.2.3.1. Choix du protocole de validation

Selon le logigramme de la figure 1.4 et du tableau 1.4 (chapitre 1) qui permettent de sélectionner un protocole de validation et sachant que : la procédure de dosage est connue ultérieurement, il n'y a pas d'effet matrice et l'étalonnage ne se fait pas à un niveau de concentration, le protocole adopté dans notre étude est le V2 modifié ; en utilisant 5 niveaux de concentration au lieu de trois pour les SE et les SV quant à eux comportent 5 niveaux de concentration selon l'exigence ICH.

1.2.3.2. Choix des paramètres de validation

- Limite d'acceptabilité (λ) : $\lambda = \pm 5\%$
- Probabilité de confiance (β) : $\beta = 95\%$ on choisit $\geq 95\%$ dans le domaine pharmaceutique.

1.2.3.3. Préparation des solutions

1.2.3.3.1. Préparation du diluant

Dans une fiole jaugée de 500 ml, mélanger 250ml d'éthanol absolue avec 250 ml d'eau distillée, agiter et mettre le mélange à l'ultrason pendant 5 minutes.

1.2.3.3.2. Préparation du placebo

Dans une fiole de 100ml peser une masse $m=2g$ d'acide acétique, $m=60g$ du saccharose et une masse $m=10g$ de glycérol, dissoudre dans un volume suffisant d'eau purifiée. Agiter et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

1.2.3.3.3. Préparation de la solution d'étalonnage

Chaque jour, pendant 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 2 répétitions par niveau selon le tableau 2.6 suivant :

Tableau 2.6 : Préparation des solutions des standards d'étalonnage

Niveaux	80%		90%		100%		110%		120%	
Répétition	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Prise d'essai Théorique du PHBM	160mg		180mg		200mg		220mg		240mg	
Prise d'essai Théorique du PHBP	16mg		18mg		20mg		22mg		24mg	
Protocole	-Peser chaque prise d'essai du méthyle et du propyle parabènes pour chaque répétition séparément dans deux fioles de 100ml (solution mère); -Ajouter environ 50 ml du diluant et mettre dans l'ultrason pour une dissolution complète ; -Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères ; -Mettre 5 ml de chacune des solutions mères dans une fiole de 50 ml ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 1/10) ;									

	<ul style="list-style-type: none"> -Agiter par retournement pour chaque prise d'essais ; -Effectuer une extraction pour chacune des solutions filles ; - Sécher les extraits ; -Analyser les solutions récupérées avec le méthanol par HPLC ;
Nombre d'essais réalisés pour les SE	SE = 5x3x2 = 30 essais (5 niveaux, 3 séries, 2 répétitions)

1.2.3.3.4. Solution des standards de validation

Chaque jour, pendant les 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 3 répétitions par niveau selon le tableau 2.7 suivant :

Tableau 2.7 : Montage expérimental des SV

Niveaux	80%			90%			100%			110%			120%		
Répétition	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Prise d'essai Théorique de PHBM	160mg			180mg			200mg			220mg			240mg		
Prise d'essai Théorique du PHBP	16mg			18mg			20mg			20mg			24mg		
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> -Peser chaque prise d'essai du méthyle et du propyle parabènes pour chaque répétition séparément dans deux fioles de 100ml (solution mère); -Ajouter environ 50 ml du diluant et mettre dans l'ultrason pour une dissolution complète ; -Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères ; -Mettre 5 ml de chacune des solutions mères dans une fiole de 50 ml ; -Ajouter 5ml du placebo ; -Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 1/10) ; -Agiter par retournement pour chaque prise 														

	d'essais ; -effectuer une extraction pour chacune des solutions filles ; - Sécher les extraits ; -Analyser les solutions récupérées avec le méthanol par HPLC.
Nombre d'essais réalisés pour les SV	SV = 5x3x3 = 45 solutions (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)

1.2.3.3.5. Préparation de la phase mobile

Tampon phosphate / MET 50/50

Dans une fiole de 500ml, peser m=3.85mg de KH_2PO_4 ;compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée après l'avoir mis dans l'ultrason pendant 5 mn avec une proportion d'eau qui permet une solubilisation. Mélanger le tampon préparé avec 500ml de méthanol grade HPLC par la suite agitées le mélange avec un agitateur magnétique. Filtrer à l'aide du dispositif de filtration sous vide en utilisant des filtres SUPELCO, puis verser dans le réservoir de la phase mobile. [1]

1.2.3.4. Conditions chromatographiques

Tableau 2.8 : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage

Colonne	Longueur	15cm
	Diamètre	4.6 mm
	Taille des particules	5µm
	Phase stationnaire	Gel de silice octadecylesilyle (C18)
Détection	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=272$ nm	
Volume d'injection	10 Ml	
Temps d'analyse	20 min	
Débit	1.5mL /min	
Température	Ambiante	
Phase mobile	Tampon phosphate/MET 50/50	

Partie 2 : Résultats et discussions

1. Etudes statistiques des résultats de plan d'expérience

1.1. Plan composite centré

Le Tableau 2.9 représente la matrice d'expériences ainsi que les résultats obtenus après l'extraction. Les facteurs étudiés sont exprimés en valeurs codées.

Tableau 2.9 : Matrice du plan composite centré et les réponses enregistrées

N° D'EXP	pH du milieu	Volume de la phase aqueuse	Type de solvant	Aire du pic PHBM	Aire du pic PHBP
1	-1	-1	S1	183312	50434
2	1	-1	S1	35871	4493
3	-1	1	S1	118650	46383
4	1	1	S1	1388	0
5	-1	0	S1	207557	55889
6	1	0	S1	27580	4778
7	0	-1	S1	114194	41221
8	0	1	S1	105632	43983
9	-1	-1	S2	3,59321e+006	338216
10	1	-1	S2	1,97543e+006	262080
11	-1	1	S2	3,6719e+006	337247
12	1	1	S2	848881	199270
13	-1	0	S2	3,61507e+006	336527
14	1	0	S2	1,9659e+006	293837
15	0	-1	S2	2,39446e+006	225027
16	0	1	S2	2,77544e+006	275425
17	0	0	S1	175842	73756
18	0	0	S2	2,95832e+006	295388
19	0	0	S2	2,94973e+006	277783
20	0	0	S2	2,01384e+006	181560

1.1.1. Validation du modèle

Pour valider le modèle obtenu dans le domaine étudié, Il faut tout d'abord vérifier l'adéquation du modèle mathématique, puis l'analyse des coefficients du modèle permet de déterminer les facteurs significatifs ainsi que les interactions pour pouvoir écrire l'équation du modèle et enfin l'analyse de la variance pour valider ou non le modèle.

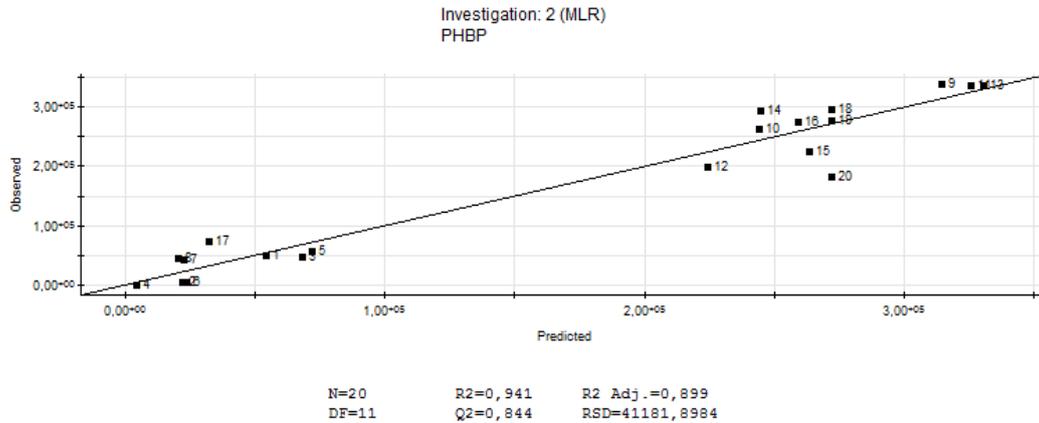


Figure 2.2 : Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour l’aire de pic du PHBP

1.1.1.2. Facteurs significatifs

On dit qu’un coefficient est significatif lorsque la barre verticale (son intervalle de confiance) ne coupe pas l’axe horizontal, ce qui signifie un bloc de dispersion autour d’une valeur significatif et loin de zéro.

- **Réponse 1 : Aire du pic du PHBM**

Au seuil de signification de 5%, les facteurs significatifs pour le PHBM sont les termes linéaire et quadratique du pH et le type de solvant ainsi que les deux interactions (PH/Solv Hexane) et (PH/Solv Diéthyl-E)

L’influence des facteurs et leurs interactions sur la réponse sont illustrées dans la figure 2.3 ci –dessous

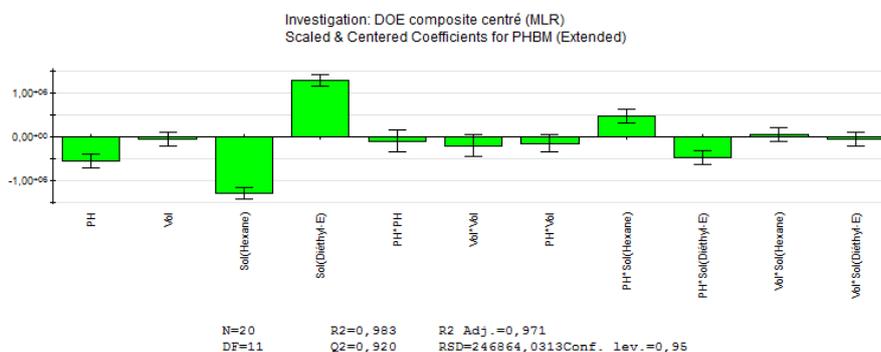


Figure 2.3 : Histogramme de l’influence des coefficients sur l’aire de pic du PHBM

- **Réponse 2 : Aire du pic du PHBP**

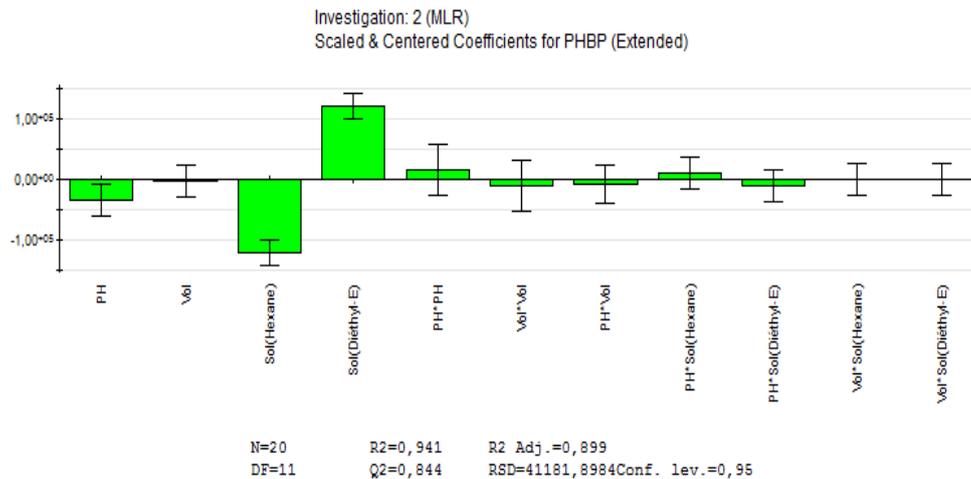


Figure 2.4 : Histogramme de l'influence des coefficients sur l'aire du pic du PHBP

Au seuil de signification de 5%, les facteurs significatifs pour l'aire de pic du PHBP sont les termes linéaire et quadratique du pH ainsi que le type de solvant (Hexane et diéthyl-éther) (figure2.4)

1.1.1.3. Analyse de la variance

L'analyse de la variance nous permet de voir si les variables retenues pour la modélisation ont dans leur ensemble un effet significatif sur la réponse. Les modèles avec des valeurs de p-value proches de zéro sont statistiquement significatifs et considérés comme appropriés pour décrire la réponse étudiée correspondante. Et si le F de Fisher expérimental (Fobs) est supérieur à F de Fisher donnée par les tables (F crit) (Annexe 6), le modèle est jugé valide. Les résultats de l'analyse de la variance pour chaque réponse sont :

- **Réponse 1 : Air de pic du PHBM**

D'après le tableau 2.5 de l'analyse de la variance (ANOVA), les valeurs de p-value sont inférieures à 0,05 et $F_{obs} > F_{crit}$. $R^2 = 0.969$ donc le modèle est jugé validé.

$F_{crit} = F(\text{régression}/\text{résiduelle}) = F(0.05, 11, 8) = 2.948$ au seuil de signification $\alpha = 0,05$.

Tableau 2.10 : Analyse de la variance pour l'aire du pic du PHBM

	Somme des carrés	DDL	Carrée moyen	Fobs	Fcrit	p-Value
Régression	3,76295e+013	8	4,70368e+012	42.6452	2.948	0.000
Résidus	1,21328e+012	11	1,10298e+011			
Total	3,88428e+013	19	2,04436e+012			

- Réponse 2 : Aire du pic du PHBP

Tableau 2.11 : Analyse de la variance pour l'aire du pic du PHBP

	Somme des carrés	DDL	Carrée moyen	Fobs	Fcrit	p-Value
Régression	2,99386e+011	8	3,74233e+010	22,0663	2.948	0.000
Résidus	1,86554e+010	11	1,69595e+009			
Total	3,18042e+011	19	1,6739e+010			

D'après le tableau 2.11 de l'analyse de la variance (ANOVA), les valeurs de p-value sont inférieures à 0,05 et Fobs est supérieure à Fcrit. $R^2 = 0.941$ donc le modèle est jugé validé.

1.1.1.4. Etude de résidus

Pour compléter l'analyse statistique du modèle. Il faut s'assurer que la valeur des résidus ne soit pas importante. Si le nuage de point est aligné aléatoirement le long d'une droite on conclut que les résidus sont normalement distribués. Seules des causes aléatoires sont alors à l'origine de la dispersion des résidus autour de leur moyenne. Les résultats obtenus pour chaque réponse sont:

- Réponse 1 : Aire du pic du PHBM

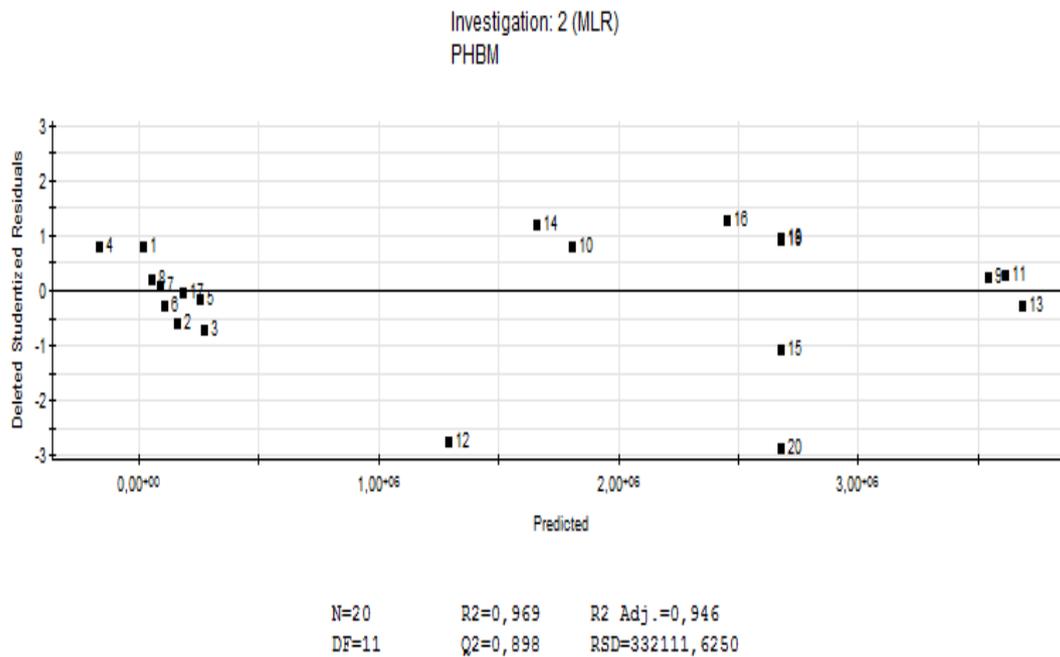


Figure 2.5: Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour l'aire de pic du PHBM

- Réponse 2 : Aire du pic du PHBP

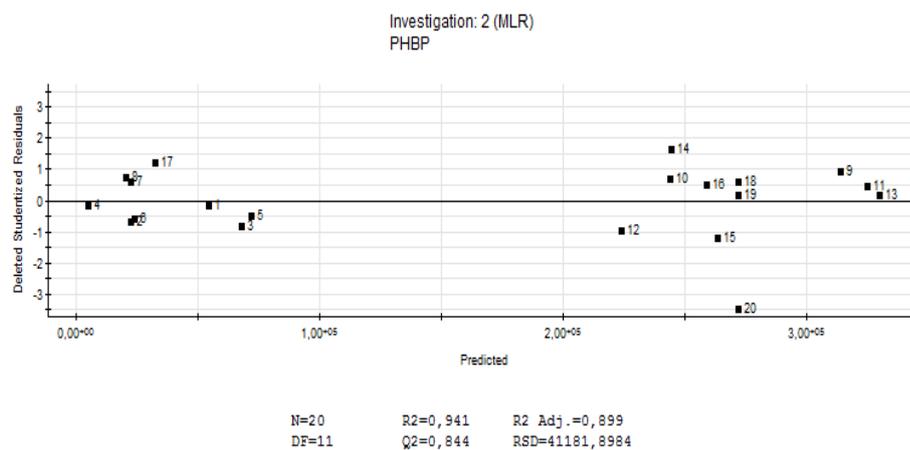


Figure 2.6: Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour l'aire du pic du PHBP

Les figures 2.5 et 2.6 présentent l'évolution des résidus estimés en fonction des réponses prévues par le modèle estimé respectivement pour l'aire du pic du PHBM et du PHBP. La dispersion des points observés montre une dispersion aléatoire des réponses.

1.1.2. Modélisation des réponses à l'aide du logiciel Modde 6

Les valeurs de R^2 , Q^2 , validité du modèle ainsi que la reproductibilité en fonction des réponses sont montrées dans l'histogramme suivant :

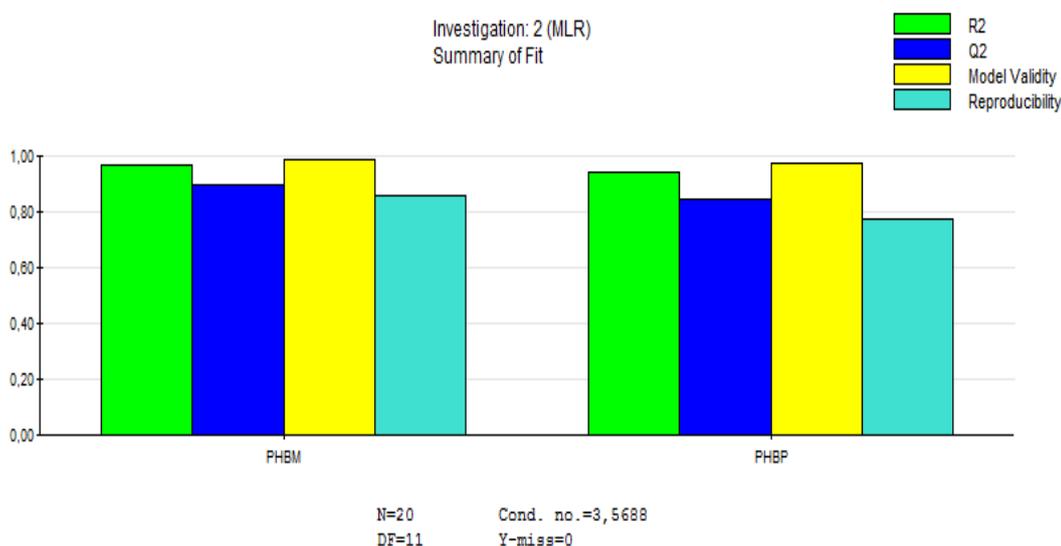


Figure 2.7 : Valeurs de R^2 , Q^2 , validité du modèle et la reproductibilité en fonction des réponses.

Plus les valeurs des coefficients R^2 et Q^2 sont proches de l'unité plus le modèle est bon et il permet de prédire la réponse. Dans notre cas les valeurs de ces deux coefficients sont acceptables pour l'aire de pic du PHBM et l'aire de pic du PHBP comme le montre la figure 2.7. La valeur de R^2 et R^2_{Aju} est proche de l'unité et la valeur de Q^2 est supérieure à 0.5 pour toutes les réponses étudiées.

1.1.1.2. Modélisation du l'aire de pic du PHBM

L'aire du pic du PHBM est décrit par l'équation (3) en éliminant les facteurs non significatifs, il est en fonction du pH en terme linéaire et quadratique et de type de solvant et des deux interactions (PH*Solv(Hexane)) et (PH*Solv (Diéthyl-E))

$$\text{PHBM} = 142873 - 544554 * \text{pH} - 1246740 * \text{Solv (Hexane)} + 1246740 * \text{Solv (Diethyl-E)} + 470441 * \text{Ph} * \text{Solv (Hexane)} - 470441 * \text{pH} * \text{Solv (Diethyl-E)} \quad (3)$$

D'après cette équation, nous remarquons que le pH ainsi que le solvant hexane ont une influence négative sur la réponse, la valeur du pH la plus basse donne des valeurs de la réponse les plus élevées, l'extraction avec le solvant Hexane donne les valeurs du pic les plus basse alors que le solvant diéthyl-éther influe positivement.

La figure 2.8 ci dessous présente la surface de réponse de l'aire du pic du PHBM en fonction du pH et du volume de la phase aqueuse, nous constatons que les meilleurs résultats pour l'aire du pic du PHBM sont obtenus aux niveaux bas du pH et de volume de la phase aqueuse.

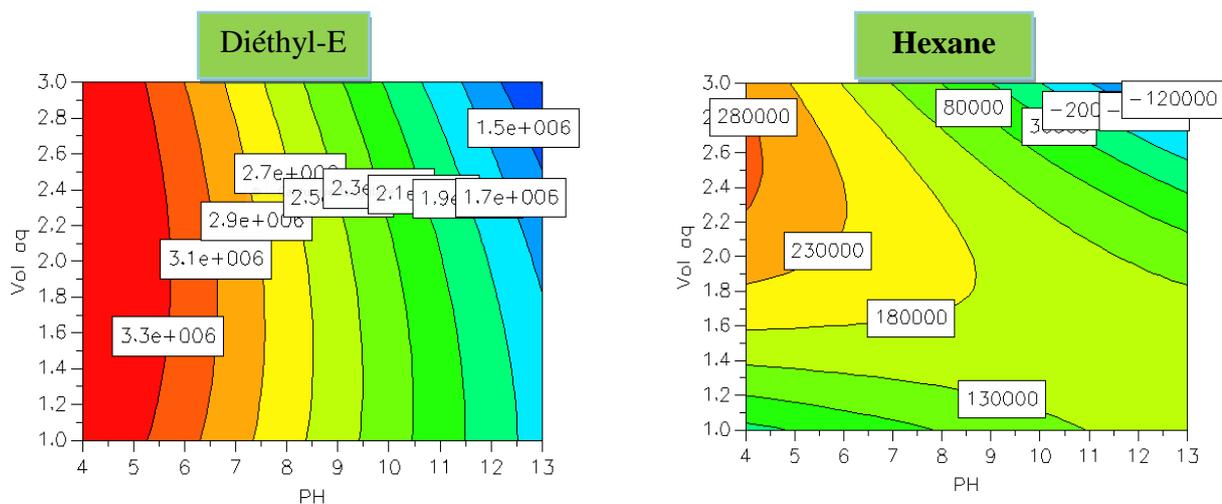


Figure 2.8 : Courbe iso-réponse de l'aire de pic du PHBM en fonction du pH et du volume de la phase aqueuse

1.1.2.1. Modélisation de l'aire du pic du PHBP

Le résultat de la modélisation du PHBP est décrit par l'équation (3), il est en fonction du pH et de type de solvant en terme linéaire et quadratique.

$$\text{PHBP} = 152110 - 33353, 2 * \text{pH} - 119860 * \text{Solv (Hexane)} + 119860 * \text{Solv (Diethyl-E)} \quad (3)$$

D'après cette équation, nous remarquons que le pH et Le solvant hexane ont une influence négative sur la réponse, alors que Le solvant diéthyl-éther influe positivement. La figure 2.9 suivante de la surface de réponse du l'aire du pic du PHBP en fonction de pH et de volume de la phase aqueuse, montre clairement que les meilleurs résultats pour l'aire du pic du PHBP sont obtenus aux niveaux bas du pH et de volume de la phase aqueuse.

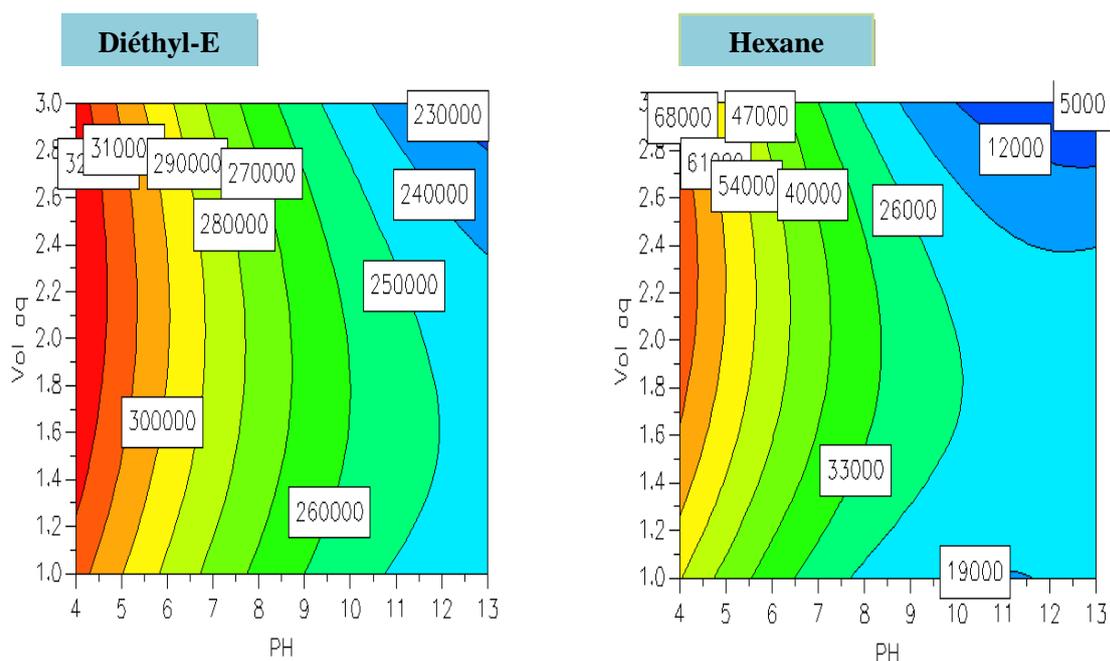


Figure 2.9 : Courbe iso-réponse de l'aire de pic du PHBP en fonction du pH et du volume de la phase aqueuse

1.1.3 .Phase d'optimisation

Pour avoir une extraction optimale des deux conservateurs nous avons utilisé le module «optimizer » du logiciel Modde 6. Les propriétés voulues pour l'extraction sont données dans le tableau 2.12

Tableau 2.12 : conditions souhaitées pour l'extraction optimale

Réponses	Critère	Min	Target	Max
Aire de pic du PHBM	Maximiser	3,49528e+006	3,88091e+006	
Aire de pic du PHBP	Maximiser	314210	346789	

Le module d'optimisation donne une solution possible pour les deux réponses. Le tableau suivant donne la solution possible donnée par l'optimiseur du logiciel, sachant que le

volume de la phase aqueuse a été fixé à un niveau bas vu que ce facteur est un facteur non influent.

Tableau 2.13 : Solution fournie par l'optimiseur du logiciel Modde 6

	PH	Vol aq	Solv	PHBM	PHBP
1	4	1	Diéthyl-E	3,5434e+006	314330

2. Etude statistique des résultats de validation

2.1. Résultats

La technique de dosage utilisée dans notre travail est la chromatographie liquide à haute performance « HPLC » (Annexe 5).

2.1.1. Spécificité et effet matrice

La spécificité de la méthode est démontrée par deux méthodes

2.1.1.1. Par comparaison des chromatogrammes

L'évaluation de la spécificité est faite par la comparaison du chromatogramme d'un standard chargé des deux conservateurs PHBM et PHBP à un niveau de concentration choisi (niveau 100%) et celui du placebo, ainsi qu'avec celui du diluant, les résultats sont illustrés dans les chromatogrammes suivants :

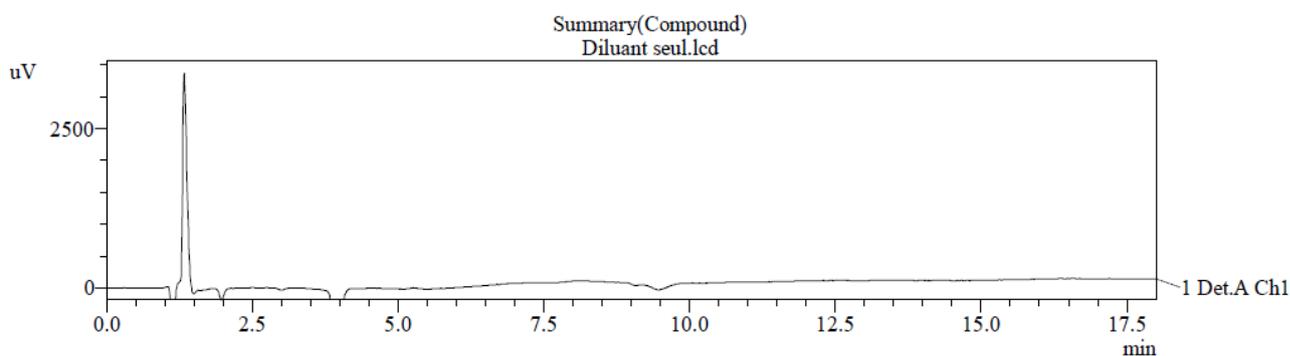


Figure 2.10 : Chromatogramme du diluant non chargé de PHBM et PHBP

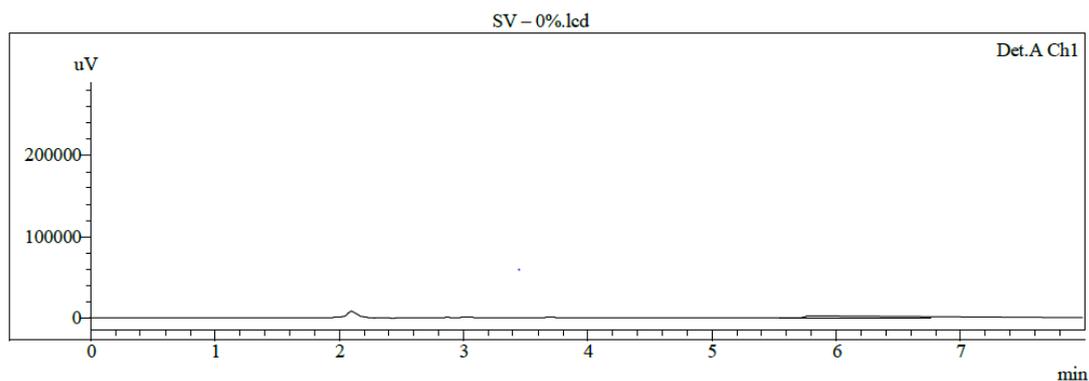


Figure 2.11 : Chromatogramme du placebo non chargé du PHBM et PHBP

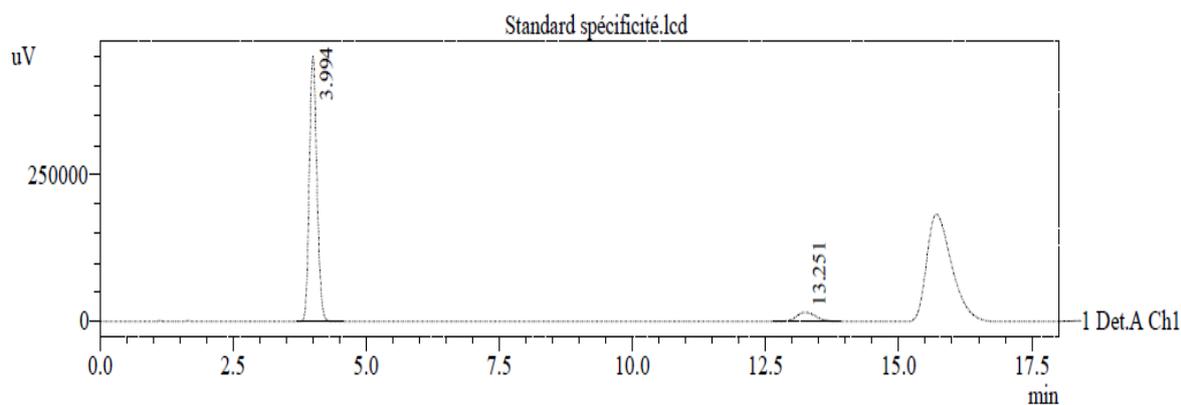


Figure 2.12 : Chromatogramme du standard chargé du PHBM et PHBP

Le tableau 2.14 suivant représente les résultats de la superposition des trois chromatogrammes

Tableau 2.14 : Résultats de la superposition des quatre chromatogrammes

Solutions	Temps de rétention (min)		Superposition
Diluant non chargé	Absence		Absence
placebo non chargé du PHBM et PHBP			
Standard chargé de PHBP et PHBM	PHBM	4.3	Concluante
	PHBP	12.4	

2.1.1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

Les figures 2.13 ci-dessous regroupent les différentes fonctions de réponses qui expriment la relation existante entre les masses introduites en abscisse et les aires de pics (réponses) en ordonnées pour le PHBM et PHBP

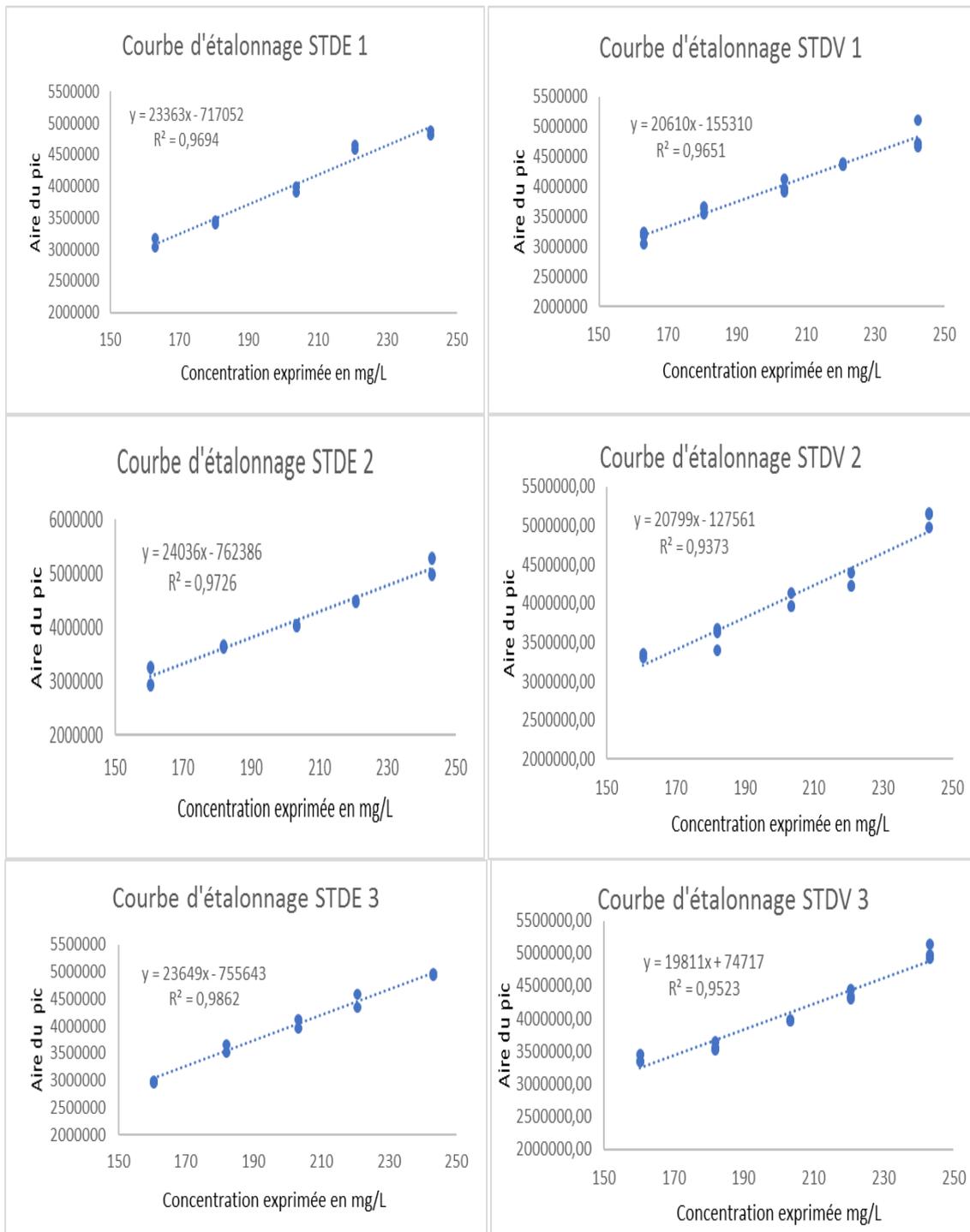


Figure 2.13: Courbes d'étalonnage obtenues pour les SE et SV des trois séries pour le PHBM

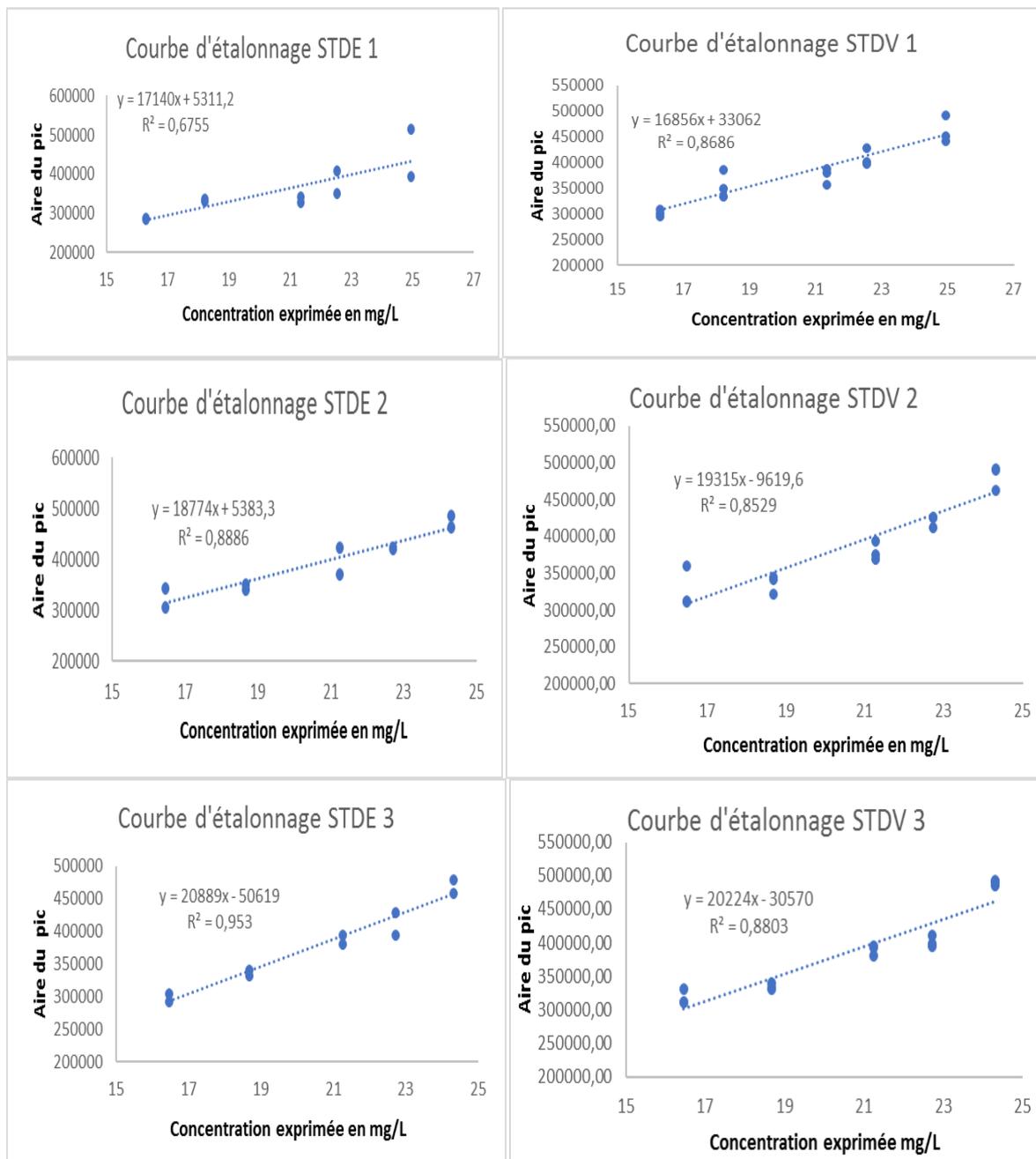


Figure 2.14: Courbes d'étalonnage obtenues pour les SE et SV des trois séries pour le PHBP

Le coefficient de détermination exprime la partie de la variance totale de la réponse expliquée par le modèle. Ce coefficient est souvent abusivement interprété comme une évaluation de la qualité d'ajustement d'un modèle. Il en n'est rien et s'imposer des contraintes du type $R^2 > 0,99$ n'est pas un gage de qualité des résultats qui seront obtenus. [25]

Les résultats de la comparaison des deux pentes de la droite de régression obtenue sur la gamme SE et la droite obtenue sur la gamme SV sont évalués dans les tableaux suivant :

- **PHBM**

Les résultats obtenus pour le PHBM sont les suivant :

Tableau 2.15 : Résultats obtenus à partir de la gamme sans matrice pour la PHBM

Validation analytique selon le protocole SFSTP 2006						
Gamme standard d'étalonnage (sans matrice)						
Série 1		Série 2		Série 3		Niveau de []
m_{int} (mg/l)	Aire du pic	m_{int} (mg/l)	Aire du pic	m_{int} (mg/l)	Aire du pic	
162.79	3190330	160.25	2937542	160.25	2963558	80%
162.79	3050904	160.25	3269690	160.25	3009160	
180.22	3465215	181.7	3646824	181.7	3531854	90%
180.22	3401813	181.7	3670637	181.7	3660601	
203.61	3906011	203.14	4042174	203.14	3977172	100%
203.61	4000898	203.14	4025879	203.14	4136916	
220.4	4596740	220.52	4494887	220.52	4346745	110%
220.4	4661776	220.52	4484086	220.52	4595020	
242.27	4888062	243	4990946	243	4977034	120%
242.27	4827053	243	5296535	243	4951391	
Pente	23362.62	pente	24035.58	Pente	23649.27	
Ord à l'origine	-717051.75	Ord à l'origine	-762386.14	Ord à l'origine	-755643.33	

Tableau 2.16: Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de la gamme sans matrice pour la PHBM

Données droite d'étalonnage SE 1			
		Ecart-type	Variance
Pente	0.04	0.0014200	0.0000020
L'origine	-0.08	0.0359024	0.0012890

Tableau 2.17 : Résultats obtenus à partir de la gamme avec matrice pour le PHBM

Gamme standard de validation (forme reconstituée)						Alignement des réponses			Niveau de [] (%)
Série 1		Série 2		Série 3		Série 1	Série 2	Série 3	
m_{int} (mg/l)	Aire du pic	m_{int} (mg/l)	Aire du pic	m_{int} (mg/l)	Aire du pic				
162.79	3249587	160.3	3349059	160.3	3349059	3249587	3349059	3349059	80%
162.79	3290065	160.3	3355235	160.3	3355235	3190065	3355235	3355235	
162.79	3051557	160.3	3315833	160.3	3465215	3051557	3315833	3465215	
180.22	3670637	181.7	3412725	181.7	3531854	3670637	3412725	3531854	90%
180.22	3646824	181.7	3683313	181.7	3660601	3646824	3683313	3660601	
180.22	3565779	181.7	3631865	181.7	3565779	3565779	3631865	3565779	
203.61	4128689	203.1	3974639	203.1	3992571	4128689	3974639	3992571	100%
203.61	3921673	203.1	3971743	203.1	3977172	3921673	3971743	3977172	
203.61	3977289	203.1	4142846	203.1	3975549	3977289	4142846	3975549	
220.4	3473024	220.52	4405288	220.52	4346745	4373024	4405288	4346745	110%
220.4	3459939	220.52	4234686	220.52	4320837	4359939	4234686	4320837	
220.4	4404029	220.52	4238756	220.52	4458346	4404029	4238756	4458346	
242.27	5114881	243	5153146	243	5153146	5114881	5153146	5153146	120%
242.27	4680975	243	4978579	243	4933529	4680975	4978579	4933529	
242.27	4738839	243	5173602	243	4978579	4978579	5173602	4978579	
Série 1		Série 2		Série 3					
Pente	20609.6794	Pente	20798.9546	pente	19810.9781				
Ord à l'origine	-155309.54	Ord à l'origine	-127560.65	Ord à l'origine	74716.9177				

Tableau 2.18 : Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de gamme avec matrice pour la PHBM

Données droite de validation			
		Ecart -type	Variance
Pente	0.04	0.0014478	0.0000021
L'origine	-0.09	0.0366041	0.0012399

Tableau 2.19 : Comparaison des pentes par le test de STUDENT pour le PHBM

Test de STUDENT		
Ddl	21	VRAI
β	0,95	
α	0,05	
$t_0=$	2.07961384	
$t_{crit}=$	0.72110843	
Si vrai : la méthode est spécifique		

- Si t_{crit} est inférieur à t_0 , l'hypothèse est confirmée, de ce fait la méthode est statiquement démontrée spécifique.
- Vrai : signifie que l'hypothèse $t_c < t_0$ est confirmée

- PHBP

Tableau 2.20 : Résultats obtenus à partir de la gamme sans matrice de le PHBP

Validation analytique selon le protocole SFSTP 2006						
Gamme standard d'étalonnage						
Série 1		Série 2		Série 3		Niveau de [] (%)
m_{int} (mg)	Aire de pic	m_{int} (mg)	Aire de pic	m_{int} (mg)	Aire de pic	
16.27	289228	16.45	307145	16.42	305569	80%
16.27	286172	16.45	343462	16.42	292564	
18.2	332124	18.66	341835	18.65	331947	90%
18.2	337602	18.66	351733	18.65	341546	
21.33	328999	21.24	370555	21.26	380744	100%
21.33	343970	21.24	423736	21.26	394441	
22.52	408766	22.7	423736	22.72	395566	110%
22.52	353180	22.7	420154	22.72	430275	
24.93	395566	24.3	464701	24.37	459873	120%
24.93	516991	24.3	487321	24.37	479133	
Pente	17140.37	pente	18773.80	Pente	20889.44	
Ord à l'origine	5311.25	Ord à l'origine	5383.25	Ord à l'origine	-50618.86	

Tableau 2.21 : Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de la gamme sans matrice de PHBP

Données droite d'étalonnage SE 1			
		Ecart-type	Variance
Pente	17140.37	4200.07	17640558.09
L'origine	5311.25	87691.46	7689791289.37

Tableau 2.22 : Résultats obtenus à partir de la gamme avec matrice de PHBP

Gamme standard de validation (forme reconstituée)						Alignement des réponses			Niveau de [] (%)
Série 1		Série 2		Série 3		Série 1	Série 2	Série 3	
m _{int} (mg/l)	Aire de pic	m _{int} (mg/l)	Aire de pic	m _{int} (mg/l)	Aire du pic				
16.27	301130	16.45	312302	16.42	312301	312301	312302	312301	80%
16.27	308548	16.45	311847	16.42	311854	308548	311847	311854	
16.27	296586	16.45	359987	16.42	332124	296586	359987	332124	
18.2	350780	18.66	322309	18.65	331947	350780	322309	331947	90%
18.2	386234	18.66	347823	18.65	341546	386234	344823	341546	
18.2	333644	18.66	342108	18.65	333644	333644	342108	333644	
21.33	388787	21.24	369661	21.26	394441	388787	369661	394441	100%
21.33	357066	21.24	376357	21.26	380744	357066	376357	380744	
21.33	380744	21.24	393600	21.26	395566	380744	393600	395566	
22.52	401044	22.7	425689	22.72	395566	401044	425689	395566	110%
22.52	427981	22.7	412587	22.72	400058	427981	412587	400059	
22.52	398863	22.7	425879	22.72	412567	398863	425879	412567	
24.93	492580	24.3	491409	24.37	485668	492580	491409	485668	120%
24.93	441934	24.3	492540	24.37	491409	441934	492540	491409	
24.93	451112	24.3	463141	24.37	492540	451112	463141	492540	
Série 1		Série 2		Série 3					
Pente	16855.841 9	Pente	19314.7349	pende	20224.2205				
Ord à origine	33062.398 1	ord à origine	-9619.6366	ord à origine	-30569.638				

Tableau 2.23 : Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de gamme avec matrice pour le PHBP

Données droite de validation			
		Ecart -type	Variance
Pente	16855.84	1818.37	3306481.85
L'origine	33062.40	37965.07	1441346423.51

Tableau 2.24 : comparaison des pentes par le test de STUDENT pour PHBP

Test de STUDENT		
Ddl	21	VRAI
β	0.95	
α	0.05	
$t_0=$	2.07961384	
$t_c=$	0.06216661	
Si vrai : la méthode est spécifique		

La superposition des courbes d'étalonnage et de validation de PHBM et PHBP est présentée dans les figures 2.15 et 2.16 ci-dessous :

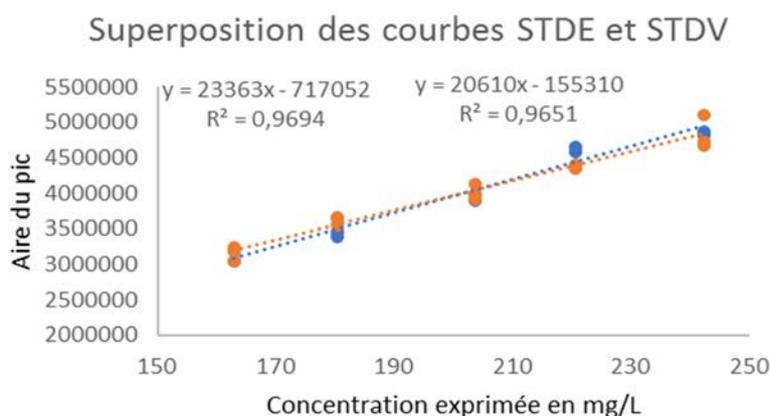


Figure 2.15 : Superposition des courbes d'étalonnage et de validation de PHBM

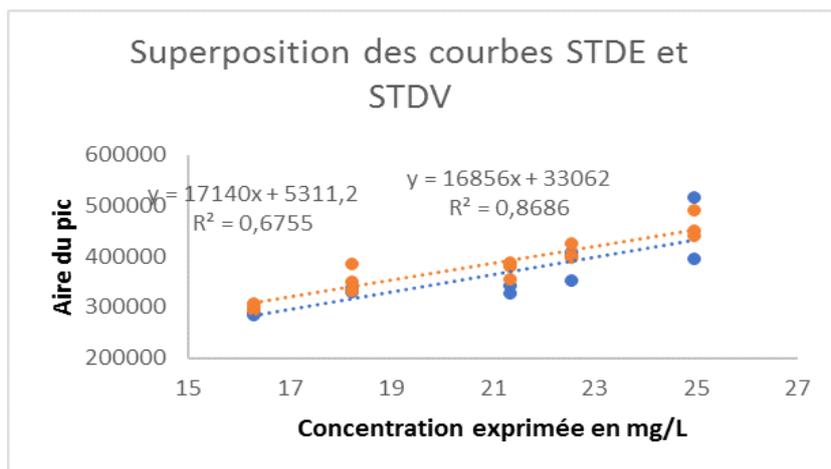


Figure 2.16 : Superposition des courbes d’étalonnage et de validation de PHBP

2.1.1.3. Vérification d’erreurs systématiques

La vérification d’erreurs systématiques est résumée dans les tableaux 2.25 et 2.26 ci-dessous :

Tableau 2.25 : Comparaison des deux pentes SE et SV pour PHBM

Données droite d’étalonnage SE 1				Données droite de validation SV1			
		Ecart-type	Variance			Ecart -type	variance
Pente	0.04	0.0014200	0.0000020	Pente	0.04	0.0014478	0.0000021
Ord, à l’origine	-0.08	0.0359024	0.0012890	Ord à l’origine	-0.09	0.0366041	0.0013399

Tableau 2.26 : Vérification des erreurs systématiques par le test de STUDENT de PHBM

Test de STUDENT		
Ddl	21	VRAI
β	0,95	
α	0,05	
t₀	2,07961384	
t_c	0.26732363	
Si vrai : absence d’erreurs systématique		

Tableau 2.27 : Comparaison des deux pentes SE et SV pour PHBP

Données droite d'étalonnage SE 1				Données droite de validation SV1			
		Ecart-type	Variance			Ecart – type	variance
Pente	17140. 37	4200.07	17640558.09	Pente	16855.84	18018.37	3306481.85
Ord à l'origine	5311.2 5	87691.46	7689791289.37	Ord à l'origine	33062.40	37965.07	1441346423. 51

Tableau 2.28 : Vérification des erreurs systématiques par le test de Student de PHBP

Test de STUDENT		
Ddl	21	VRAI
β	0,95	
A	0,05	
t₀	2.07961384	
t_c	0.29041465	
Si vrai : absence d'erreurs systématique		

2.1.2. Fonction de réponse

La relation existante entre l'aire du pic (réponse instrumentale) et la masse introduite dans les standards d'étalonnage (concentration), obtenue sur chacune des trois séries, est représentée pour quatre modèles mathématiques.

Les résultats qui seront désormais élucidés sont basés sur le modèle mathématique choisi, en l'occurrence la fonction de réponse : $\ln y = f(\ln x)$ qui nous a donné les résultats suivants :

- Cas de PHBM

Tableau 2.29 : Résultats obtenus pour la fonction $\ln y = f(\ln x)$ pour PHBM

Validation analytique selon le protocole SFSTP 2006						
Gamme standard d'étalonnage						
Série 1		Série 2		Série 3		Niveau de [] (%)
m_{int} ($\ln x$)	Aire du pic ($\ln y$)	m_{int} ($\ln x$)	Aire du pic ($\ln y$)	m_{int} ($\ln x$)	Aire du pic ($\ln y$)	
5.09	14.98	5.08	14.89	5.08	14.90	80%
5.09	14.93	5.08	15.00	5.08	14.92	
5.19	15.09	5.20	15.11	5.20	15.08	90%
5.19	15.04	5.20	15.12	5.20	15.11	
5.32	15.18	5.31	15.21	5.31	15.20	100%
5.32	15.20	5.31	15.21	5.31	15.24	
5.40	15.34	5.40	15.32	5.40	15.28	110%
5.40	15.35	5.40	15.32	5.40	15.34	
5.49	15.40	5.49	15.42	5.49	15.42	120%
5.49	15.39	5.49	15.48	5.49	15.42	
Pente	1.19	Pente	1.18	Pente	1.21	
Ord à l'origine	8.91	Ord à l'origine	8.94	Ord à l'origine	8.80	

- Cas de PHBP

Tableau 2.30 : Résultats obtenus pour la fonction $\ln y = f(\ln x)$ pour PHBP

Validation analytique selon le protocole SFSTP 2006						
Gamme standard d'étalonnage						
Série 1		Série 2		Série 3		Niveau de [] (%)
$m_{\text{int}} (\ln x)$	Aire de pic ($\ln y$)	$m_{\text{int}} (\ln x)$	Aire de pic ($\ln y$)	$m_{\text{int}} (\ln x)$	Aire de pic ($\ln y$)	
2.79	12.57	2.80	12.64	2.79	12.63	80%
2.79	12.56	2.80	12.75	2.79	12.59	
2.90	12.71	2.93	12.74	2.92	12.71	90%
2.90	12.73	2.93	12.77	2.92	12.74	
3.06	12.70	3.06	12.82	3.05	12.85	100%
3.06	12.75	3.06	12.96	3.05	12.89	
3.11	12.92	3.12	12.96	3.12	12.89	110%
3.11	12.77	3.12	12.95	3.12	12.97	
3.22	12.89	3.19	13.05	3.19	13.04	120%
3.22	13.16	3.19	13.05	3.19	13.08	
Pente	0.92	Pente	0.96	Pente	1.11	
Ord à l'origine	10.00	Ord à l'origine	9.98	Ord à l'origine	9.47	

2.1.2.1. Critères de choix de la fonction de réponse

Pour le choix de la fonction de réponse qui est capable de prédire une proportion suffisante des futurs résultats qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité $[-5, +5]$, nous avons procédé au:

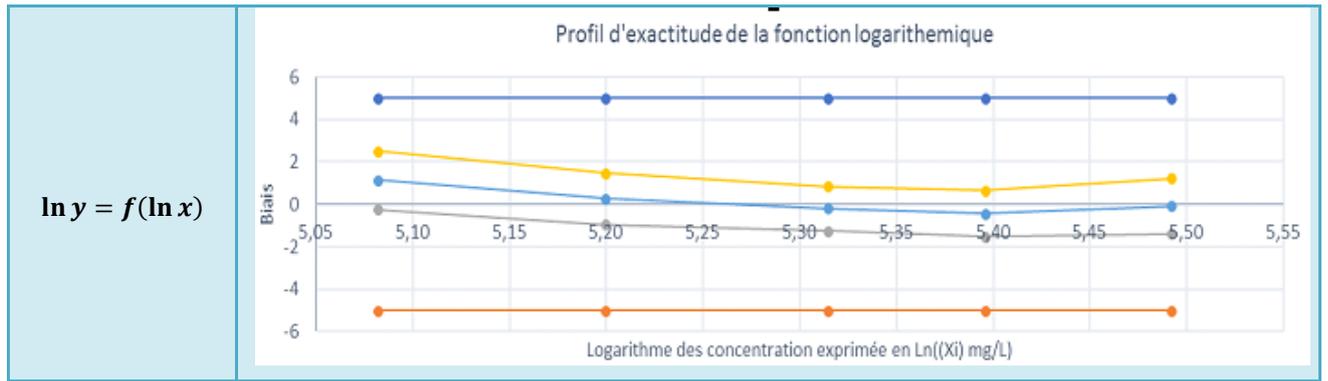
Calcul des indices : indice de justesse, indice de fidélité et l'indice d'exactitude. Ces calculs sont lourde et leurs réalisation nécessitent l'utilisation de logiciel spécialisé, sa réalisation à chaque niveau est basée sur des critères qui sont :

- La fonction qui donne un intervalle de dosage valide le plus large.
- La fonction de réponse la plus simple
- La fonction avec des limites de tolérance la plus serrées autour de la courbe de biais et autour de zéro

Dans notre travail la méthode utilisée pour le choix de la fonction de réponse est celle basée sur le profil d'exactitude .les différents modèles de régression testés aboutissant aux profils d'exactitude élucidé dans les tableaux 2.31 ci-dessous :

Tableau 2.31 : Critères de choix de la fonction de réponse pour PHBM

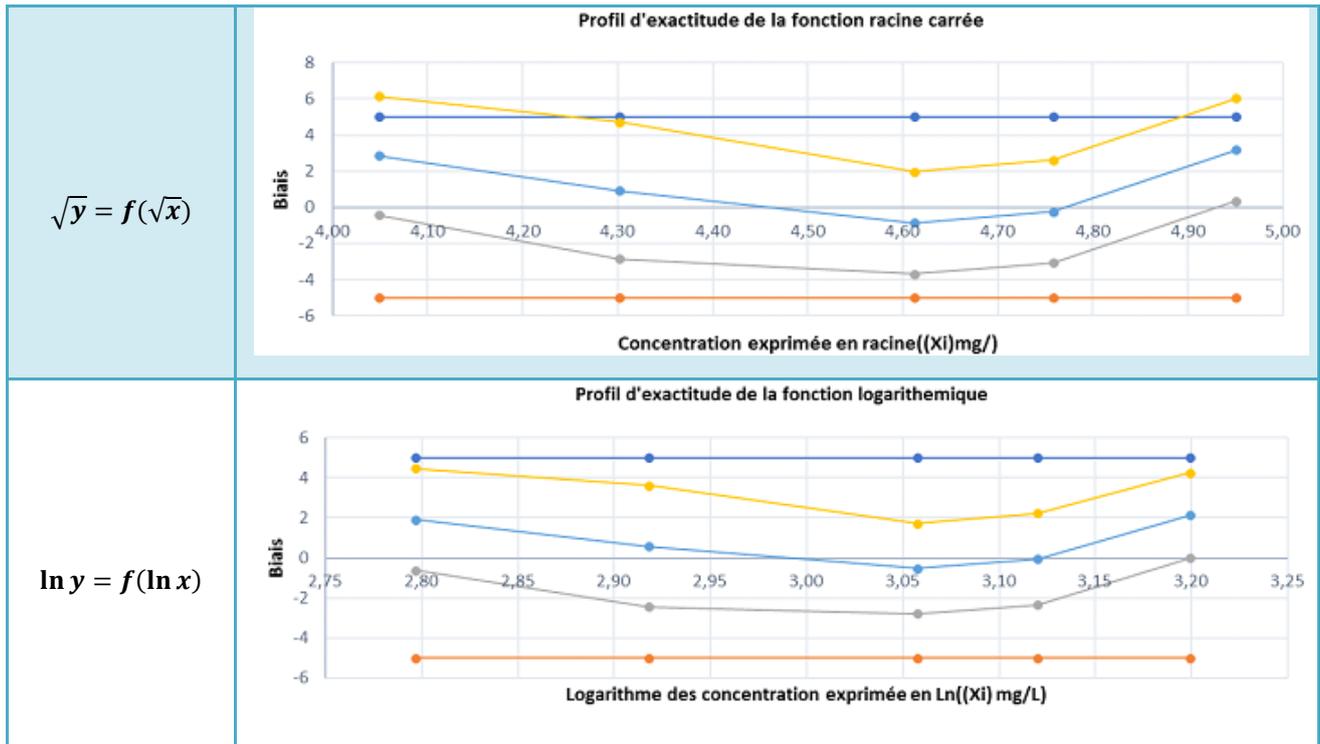
Modèle de fonction de réponse	Profil d'exactitude
	<p> ● limite d'acceptation supérieure ● limite d'acceptabilité inferieure ● biais ● limite de tolérance supérieure ● limite de tolérance inférieure </p>
$y = ax + b$	<p style="text-align: center;">Profil d'exactitude de la fonction linéaire simple</p>
$y = ax$	<p style="text-align: center;">Profil d'exactitude de la fonction linéaire passant par zéro</p>
$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$	<p style="text-align: center;">Profil d'exactitude de la fonction racine carrée</p>



- Cas de PHBP

Tableau 2.32 : Critères de choix de la fonction de réponse pour PHBP

Modèle de fonction de réponse	Profil d'exactitude
$y = ax + b$	<p> ● limite d'acceptation supérieure ● limite d'acceptabilité inférieure ● biais ● limite de tolérance supérieure ● limite de tolérance inférieure </p> <p>Profil d'exactitude de la fonction linéaire simple</p>
	<p>Profil d'exactitude de la fonction linéaire passant par zéro</p>
$y = ax$	<p>Profil d'exactitude de la fonction linéaire passant par zéro</p>



Dans le cadre de notre étude le model mathématique qui a répondu aux exigences qui est la fonction réponse de logarithme népérien : $\ln y = f(\ln x)$ afin d'ajuster le modèle mathématique.

2.1.3. Alignement des observations

L'alignement appliqué aux réponses obtenues avec les trois séries des standards de validation, sur la moyenne des masses introduites pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans les tableaux 2.33 et 2.34 suivants :

Tableau 2.33 : Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation pour PHBM

Alignement des réponses		
Réponse alignée Série 1	Réponse alignée Série 2	Réponse alignée Série 3
14.99	15.02	15.02
14.98	15.03	15.03
14.93	15.01	15.06
15.12	15.04	15.08
15.11	15.12	15.11
15.09	15.11	15.09
15.23	15.20	15.20
15.18	15.19	15.20
15.20	15.24	15.20
15.29	15.30	15.28
15.29	15.26	15.28
15.30	15.26	15.31
15.45	15.46	15.46
15.36	15.42	15.41
15.37	15.46	15.42

Tableau 2.34 : Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation de PHBP.

Alignement des réponses		
Réponse alignée Série 1	Réponse alignée Série 2	Réponse alignée Série 3
12.62	12.65	12.65
12.64	12.65	12.65
12.60	12.79	12.71
12.77	12.68	12.71
12.86	12.75	12.74
12.72	12.74	12.72
12.87	12.82	12.89
12.79	12.84	12.85
12.85	12.88	12.89
12.90	12.96	12.89
12.97	12.93	12.90
12.90	12.96	12.93
13.11	13.11	13.09
13.00	13.11	13.11
13.02	13.05	13.11

2.1.4. Prédiction inverses

C'est les concentrations que peut nous fournir la méthode pour un échantillon inconnu. Les concentrations inverses prédites des standards de validation sont calculées en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage. Ces concentrations retrouvées permettent de calculer le biais de chaque mesurage, et également de vérifier la linéarité de la méthode ; les prédictions inverses obtenues à partir des SV sont représentées dans les tableaux 2.35 et 2.36 ci-dessous :

Tableau 2.35 : Prédiction inverse obtenus à partir des SV de PHBM

Prédiction inverse			Moyenne par série	Niveau de [] (%)
Valeur prédite Série 1	Valeur prédite Série 2	Valeur prédite Série 3		
5.13	5.14	5.16	5.14	80%
5.12	5.14	5.16		
5.08	5.13	5.19		
5.24	5.16	5.20	5.21	90%
5.23	5.22	5.23		
5.21	5.21	5.21		
5.34	5.29	5.30	5.30	100%
5.29	5.29	5.30		
5.31	5.32	5.30		
5.39	5.37	5.37	5.37	110%
5.38	5.34	5.37		
5.39	5.34	5.40		
5.52	5.51	5.52	5.49	120%
5.44	5.48	5.48		
5.45	5.51	5.49		

Tableau 2.36 : Prédiction inverse obtenus à partir des SV de PHBP

Prédiction inverse			Moyenne par série	Niveau de [] (%)
Valeur prédite Série 1	Valeur prédite Série 2	Valeur prédite Série 3		
2.84	2.79	2.85	2.85	80%
2.87	2.79	2.85		
2.82	2.94	2.91		
3.01	2.82	2.91	2.93	90%
3.11	2.89	2.93		
2.95	2.88	2.91		
3.12	2.96	3.06	3.04	100%
3.03	2.98	3.03		
3.09	3.03	3.06		
3.15	3.11	3.06	3.12	110%
3.22	3.08	3.07		
3.15	3.11	3.10		
3.37	3.26	3.25	3.27	120%
3.26	3.26	3.26		
3.28	3.20	3.26		

2.1.5. Justesse

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Elle est exprimée en termes de biais absolu ou de biais relatif (%) ou de taux recouvrement et a été estimée à l'aide des tableaux suivants pour chaque niveau de concentration des SV

Tableau 2.37 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le PHBM

Biais absolu	Biais relatif(%)	Recouvrement(%)	
0.06	1.136	100.83	100.38
		100.52	
		99.79	
0.01	0.257	100.83	100.64
		100.73	
		100.36	
-0.01	-0.204	100.38	99.91
		99.57	
		99.79	
-0.02	-0.433	99.81	99.83
		99.76	
		99.92	
0.00	-0.087	100.50	99.65
		99.13	
		99.32	

Tableau 2.38 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des SV pour Le PHBP

Biais absolu	Biais relatif(%)	Recouvrement(%)	
0.05	1.918	101.83	101.95
		102.78	
		101.24	
0.02	0.579	103.60	104.18
		107.20	
		101.73	
-0.02	-0.530	101.88	100.63
		98.86	
		101.14	
0.00	-0.059	101.18	100.87
		103.45	
		100.99	
0.07	2.121	104.42	102.71
		101.26	
		101.95	

2.1.6. Calcul de la fidélité

La fidélité en ses deux conditions de répétabilité(MSM) et de fidélité intermédiaire(MSE) est exprimée en écarts types relativisés en coefficients de variation suite à l'étude de la variance du modèle choisi qui a donné les résultats suivants dans les tableaux 2.39 et 2.40 ci-dessous :

- **PHBM**

Tableau2.39 : Calcul de fidélité en écarts types relativisés pour le PHBM

MSM	MSE ₁	MSE ₂	Ecart type de répétabilité	Ecart type inter sérié
0.00244	0.00034	0.00087	0.01848	0.01528
0.00075	0.00053	0.00058	0.02293	0.00504
0.00016	0.00031	0.00027	0.01754	0.00000
0.00108	0.00019	0.00041	0.01380	0.00996
0.00061	0.00077	0.00073	0.02782	0.00000

Tableau 2.40: Calcul de fidélité en coefficients de variations pour le PHBM

Ecart type de F, I,	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
0.02	0.36	0.47
0.02	0.44	0.45
0.02	0.33	0.33
0.02	0.26	0.32
0.03	0.51	0.51

- **PHBP**

Tableau 2.41 : Calcul de fidélité en écarts types relativisés pour le PHBP

MSM	MSE ₁	MSE ₂	Ecart type de répétabilité	Ecart type inter sérié
0.00087	0.00297	0.00245	0.05452	0.00000
0.01925	0.00273	0.00686	0.05223	0.04284
0.00586	0.00127	0.00242	0.03567	0.02257
0.00714	0.00085	0.00242	0.02916	0.02644
0.00311	0.00176	0.00210	0.04195	0.01226

Tableau 2.42 : Calcul de fidélité en coefficients de variations pour le PHBP

Ecart type de F, I,	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
0.05	1.95	1.95
0.07	1.79	2.31
0.04	1.17	1.38
0.04	0.93	1.26
0.04	1.31	1.37

2.1.7. Exactitude

Les tableaux 2.43 et 2.44 suivants élucident pour chaque concentration des standards de validation son exactitude relative, et met en avant l'erreur relative maximale observée pour chaque niveau de concentration théorique

Tableau 2.43 : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le PHBM

Exactitude relative ijk			Exactitude relative ij
Série 1	Série 2	Série 3	
0.83	1.26	1.62	1.24
0.52	1.29	1.65	1.15
-0.21	1.10	2.18	1.02
0.83	-0.87	0.01	-0.01
0.73	0.37	0.58	0.56
0.36	0.14	0.16	0.22
0.38	-0.52	-0.18	-0.11
-0.43	-0.54	-0.24	-0.40
-0.21	0.13	-0.24	-0.11
-0.19	-0.43	-0.39	-0.34
-0.24	-1.05	-0.48	-0.59
-0.08	-1.03	0.000	-0.37
0.50	0.22	0.42	0.38
-0.87	-0.31	-0.24	-0.47
-0.68	0.28	-0.10	-0.17

Tableau 2.44 : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le PHBP

Exactitude relative ijk			Exactitude relative Ij
Série 1	Série 2	Série 3	
1.83	-0.42	1.83	1.08
2.78	-0.47	1.79	1.36
1.24	4.88	3.80	3.31
3.60	-3.58	-0.68	-0.22
7.20	-1.17	0.19	2.07
1.73	-1.46	-0.53	-0.08
1.88	-2.99	0.17	-0.31
-1.14	-2.37	-0.87	-1.46
1.14	-0.84	0.25	0.18
1.18	-0.33	-1.88	-0.34
3.45	-1.38	-1.56	0.17
0.99	-0.32	-0.67	0.00
4.92	2.23	1.79	2.98
1.26	2.31	2.12	1.90
1.95	0.30	2.19	1.48

2.1.8. Calcule des limites de tolérances

Les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de tolérance sont calculées pour tout les niveaux de concentration avec une probabilité β de les résultats des calcules sont résumés dans les tableaux 2.45 et 2.46 suivants :

Tableau 2.45 : Calcul des limites de tolérance pour le PHBM

Niveaux de [] (%)	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Erreur maximale observée	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
80%	0.08	1.608	2.18	-0.24	2.51
90%	0.04	0.709	0.83	-0.95	1.47
100%	0.03	0.534	0.38	-1.25	0.84
110%	0.04	0.749	0.00	-1.53	0.66
120%	0.03	0.593	0.50	-1.38	1.21

Tableau 2.46 : Calcul des limites de tolérance pour le PHBP

Niveaux de [] (%)	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Erreur maximale observée	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
80%	0.11	3.867	4.88	-0.63	4.46
90%	0.08	2.894	7.20	-2.45	3.61
100%	0.06	1.910	1.88	-2.78	1.72
110%	0.04	1.321	3.45	-2.35	2.23
120%	0.11	3.488	4.92	0.00	4.24

2.1.9. Profil d'exactitude

Les figures ci-dessous dans lesquelles l'axe horizontal représente les concentrations théoriques allant de 146.02 à 244.69 mg/L pour le PHBM et 16.44 à 24.53mg/L pour le PHBP et l'axe vertical le biais relatif représente le profil d'exactitude pour la fonction logarithmique :

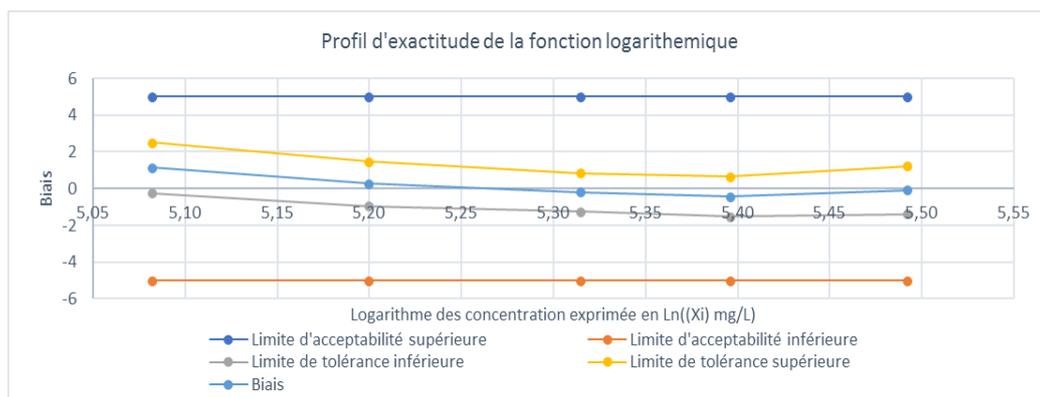


Figure 2.17 : Profil d'exactitude pour la fonction logarithmique du PHBM

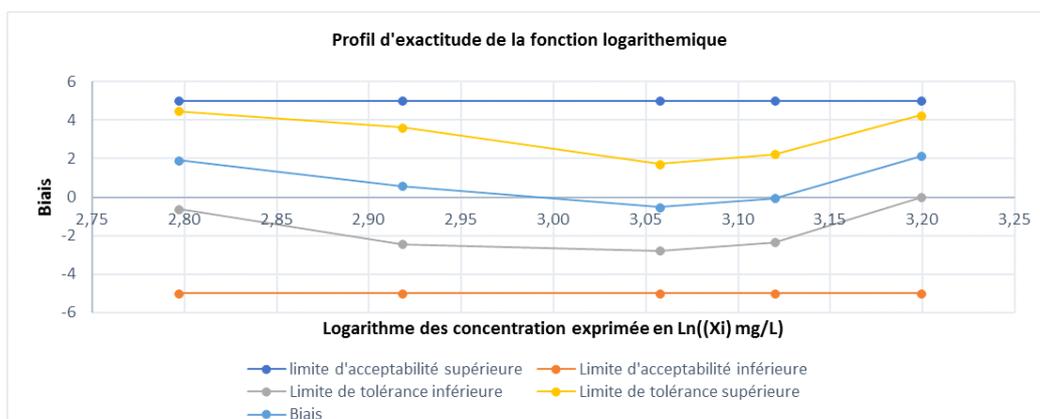


Figure 2.18 : Profil d'exactitude pour la fonction logarithmique pour le PHBP

2.1.10. Linéarité de la justesse :

Au sens de la SFSTP 2006 la linéarité exprime les valeurs prédites ou les concentrations calculées en fonction des concentrations introduite (prédites). La linéarité de la méthode de dosage est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation. La vérification de la linéarité de la méthode est résumée dans les tableaux 2.47 et 2.48 suivants :

Tableau 2.47 : Vérification de la linéarité de la méthode pour le PHBM

Niveaux de [] (%)	Données linéarité de justesse	
	Concentration introduite	Concentration prédite
80%	5.08	5.14
	5.08	5.14
	5.08	5.13
90%	5.20	5.20
	5.20	5.23
	5.20	5.21
100%	5.31	5.31
	5.31	5.29
	5.31	5.31
110%	5.40	5.38
	5.40	5.36
	5.40	5.38
120%	5.49	5.51
	5.49	5.47
	5.49	5.48

Tableau 2.48 : Vérification de la linéarité de la méthode pour le PHBP

Niveaux de [] (%)	Données linéarité de justesse	
	Concentration introduite	Concentration prédite
80%	2.80	2.83
	2.80	2.83
	2.80	2.89
90%	2.92	2.91
	2.92	2.98
	2.92	2.92
100%	3.06	3.05
	3.06	3.01
	3.06	3.06
110%	3.12	3.11
	3.12	3.12
	3.12	3.12
120%	3.20	3.29
	3.20	3.26
	3.20	3.25

la linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées (x_{calc}) ou prédites et les concentrations introduites (x) est évaluée en représentant graphiquement la fonction $[x_{calc}=(x)]$ pour les trois séries de validation conjointement les courbes de la linéarité de la méthode sont représentées dans les figures 2.19 et 2.20 ci- dessous :

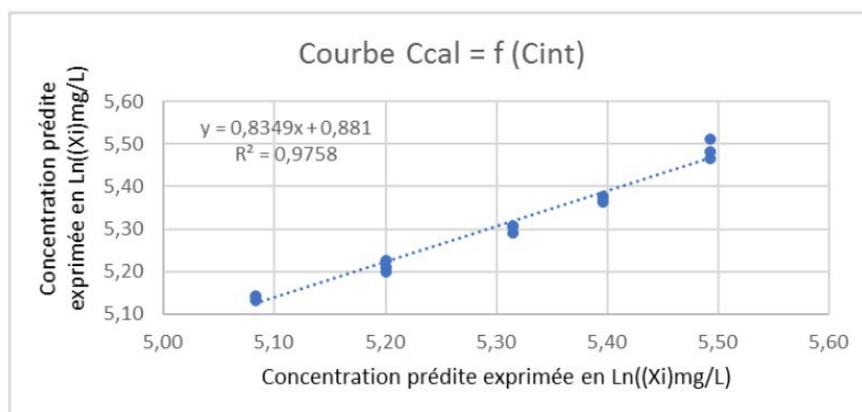


Figure 2.19 : courbe linéarité de la méthode pour le PHBM

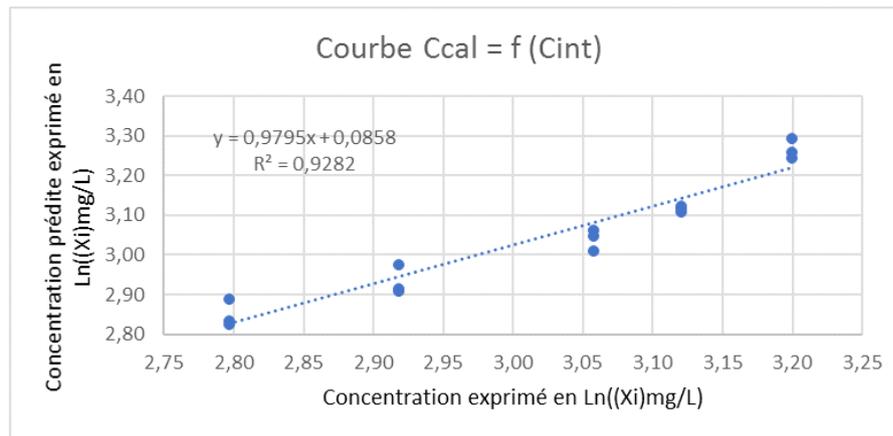


Figure 2.20 : courbe linéarité de la méthode pour le PHBP

Une analyse statistique des droites obtenues est effectuée, la pente est comparée à la valeur de référence 1, l'ordonnée à l'origine est comparée à la valeur de référence 0, et une vérification de l'ajustement est effectuée ; les données des droites de la justesse sont représentées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 2.49 : Données de la droite de linéarité de justesse pour le PHBM

Données droite de justesse			
		Ecart –type	Variance
Pente	0.83	0.04	0.00133
Ord à l'origine	0.83	0.19	0.03740

Tableau 2.50 : Données de la droite de linéarité de la justesse pour le PHBP

Données droite de justesse			
		Ecart –type	Variance
Pente	0.98	0.08	0.00571
Ord à l'origine	0.09	0.23	0.05216

La comparaison de la pente à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de Student est résumé dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 2.51 : Comparaison de la pente à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de Student pour le PHBM

Test de STUDENT					
Comparaison de la pente à 1			Comparaison de l'ordonnée à l'origine 0		
Ddl	13	Vrai	Ddl	13	Vrai
B	0.99999		β	0.99999	
A	0.00001		α	0.00001	
$t_0=$	6.95444117		$t_0=$	6.95444117	
$t_c=$	4.52418942		$t_c=$	455572376	
Si vrai la pente est comparable avec 1			Si vrai l'ord à l'origine est comparable avec 0		

Tableau 2.52 : Comparaison de la pente à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de Student pour le PHBP

Test de STUDENT					
Comparaison de la pente à 1			Comparaison de l'ordonnée à l'origine 0		
Ddl	13	Vrai	Ddl	13	Vrai
B	0.95		B	0.95	
A	0.05		A	0.05	
$t_0=$	2.16036866		$t_0=$	2.16036866	
$t_c=$	0.27065662		$t_c=$	0.37574593	
Si vrai la pente est comparable avec 1			Si vrai l'ord à l'origine est comparable avec 0		

2. 2. Discussions

2.2.1. Spécificité

2.2.1.1. Comparaison des chromatogrammes

Selon les résultats obtenus, la spécificité de la méthode est confirmée par :

L'absence de pic au temps de rétention théorique dans le chromatogramme obtenu avec le diluant seul et celui du placebo en les comparant au chromatogramme obtenus avec le standard chargé d'un même niveau de concentration pour les deux conservateurs .

2.2.1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau 2.53 et 2.54 ci-dessous

Tableau 2.53 : Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec 0 pour le PHBM

Les pentes sont-elles comparable avec 0 ?	t calculé	0.72110843	Pas d'effet matrice
	t° (0,05, 21)	2.07961384	
	Condition	t calculé < t° (0,05, 21)	
	Résultat	Vrai	
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparable avec 0 ?	t calculé	0.267323632	Pas d'erreur systématique
	t° (0,05, 21)	2.07961284	
	Condition	t calculé < t° (0,05, 21)	
	Résultat	Vrai	

Tableau 2.54 : Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec 0 pour le PHBP

Les pentes sont-elles comparable avec 0 ?	t calculé	0.06216661	Pas d'effet matrice
	t° (0,05, 21)	2.07961384	
	Condition	t calculé < t° (0,05, 21)	
	Résultat	Vrai	
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparable avec 0 ?	t calculé	0.29041465	Pas d'erreur systématique
	t° (0,05, 21)	2.07961384	
	Condition	t calculé < t° (0,05, 21)	
	Résultat	Vrai	

Nous pouvons dire qu'avec un risque inférieur à 5%, l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique est confirmée pour les deux conservateurs donc statistiquement la méthode est spécifique.

2.2.2. Choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude élucidés dans les tableaux 2.31 et 2.32 et les intervalles de validité de la méthode qui en découlent pour chaque modèle simulé et validé.

On constate que le modèle de la fonction logarithme népérien avec l'équation $\ln y = f(\ln x)$ a donné un intervalle de dosage le plus large et une erreur totale la plus serrée autour de biais et autour de zéro, ce qui nous a permis de le sélectionner comme le modèle qui convient le plus à notre méthode de dosage.

2.2.3. Profil d'exactitude

En se référant aux profils d'exactitudes élucidés dans les figures, on considère que la méthode développée dans ce présent travail est valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation de $\pm 5\%$, autrement dit du point d'intersection de la limite supérieure de l'intervalle de tolérance avec la limite d'acceptabilité jusqu'au niveau de concentration **244.69 mg/L** pour le PHBM et **24.53 mg/L** de PHBP, et cela en garantissant que seule 5 % des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent avoir des résultats non fiables qui sortent des limites d'acceptabilité.

2.2.4. Intervalle de dosage

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites de quantifications inférieure et supérieure où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

- **PHBM**

La limite de quantification inférieure est de **146.02 mg/l**.

La limite de quantification supérieure est de **244.69 mg/l**.

La méthode est tenue pour valide dans l'intervalle [**146.02 mg/l ; 244.69 mg/l**].

- **PHBP**

La limite de quantification inférieure est de **16.44 mg/l**.

La limite de quantification supérieure est de **24.53 mg/l**.

La méthode est tenue pour valide dans l'intervalle [**16.44 mg/l ; 24.53 mg/l**].

2.2.5. Fidélité

La dispersion des prédictions inverses des concentrations des trois séries de validation (PHBM et PHBP) est assez étroite pour tous les niveaux de concentration, du fait que les coefficients de variance de la répétabilité et de fidélités intermédiaires de tous les niveaux est inférieure à 1%.

Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, ils sont 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, en d'autres termes elles ne renseignent pas sur la qualité des résultats et ne permettent pas de prendre une décision sur la validité de la méthode.

2.2.6. Critères de décision sur la validité de la méthode

2.2.6.1. Erreur totale

- **PHBM**

Selon les résultats du tableau 2.45, Les erreurs maximales de tous les niveaux de concentrations sont inférieures à 2,5 % donc inférieure à la limite d'acceptation 5%.

- **PHBP**

Selon les résultats du tableau 2.46, Les erreurs maximales de tous les niveaux 1, 3,4 et 5 sont inférieures à 2,5 % donc inférieure à la limite d'acceptation 5% par contre le deuxième niveau de concentration est supérieure à la limite d'acceptation 5%.

2.2.6.2. Linéarité de la justesse

Les coefficients de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est acceptable ($R^2 = 0.9282$ pour le PHBP) et

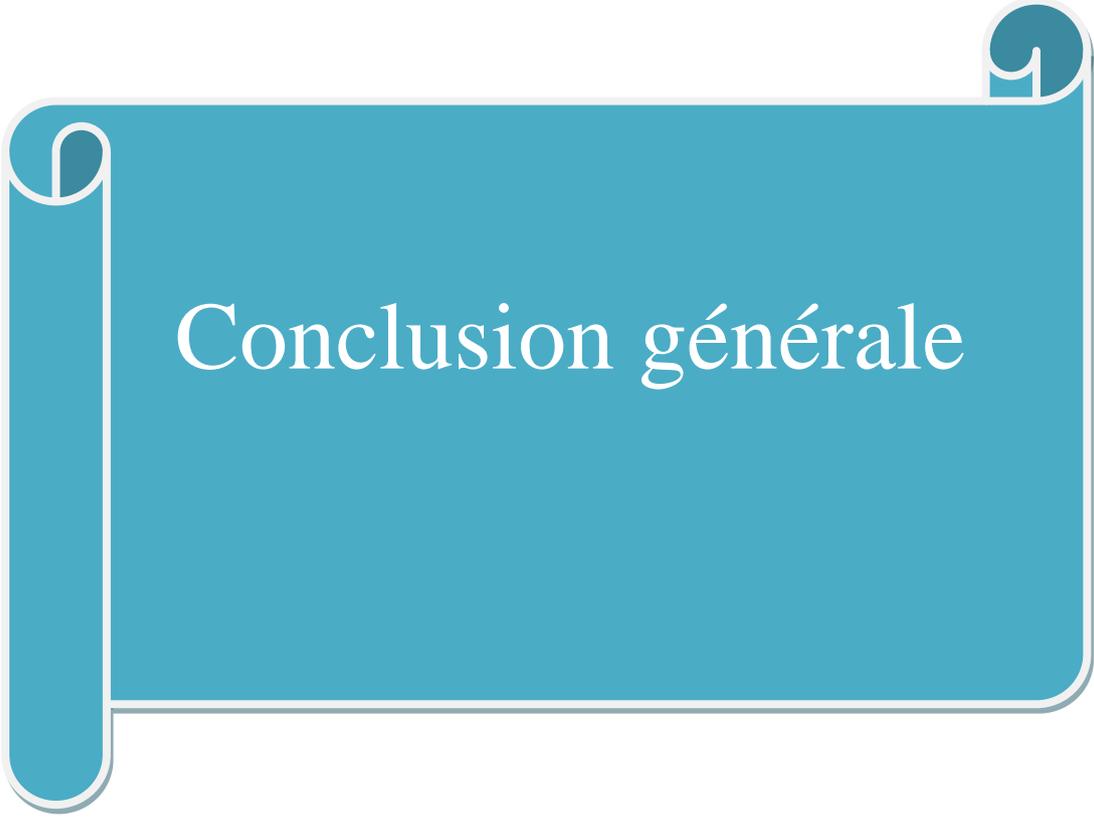
($R^2 = 0.9758$) pour le PHBM), étant donné que les deux variables ne sont pas toutes les deux indépendantes, il ne peut confirmer à lui seul la validité de la linéarité.

La pente est statistiquement comparable à 1 au risque inférieur à 5 %, en l'occurrence la pente est significativement différente de 0, cela veut dire que la régression est significative entre la variable expliquée (concentration prédite) et la variable explicative (concentration introduite).

L'ordonnée à l'origine est statistiquement comparable avec 0 au risque inférieur à 5 %, Ce qui nous amène à conclure que la linéarité de la méthode de dosage est validée.

Conclusion

La méthode de dosage du PHBM et PHBP dans le sirop reconstitué à base d'alpha-amylase par HPLC développée dans le présent travail s'est révélée exacte et valide dans l'intervalle de dosage [146.02 à 244.69mg/l] pour le PHBM et [16.44 à 24.53 mg/l] au risque inférieur à 5%.



Conclusion générale

Conclusion Générale

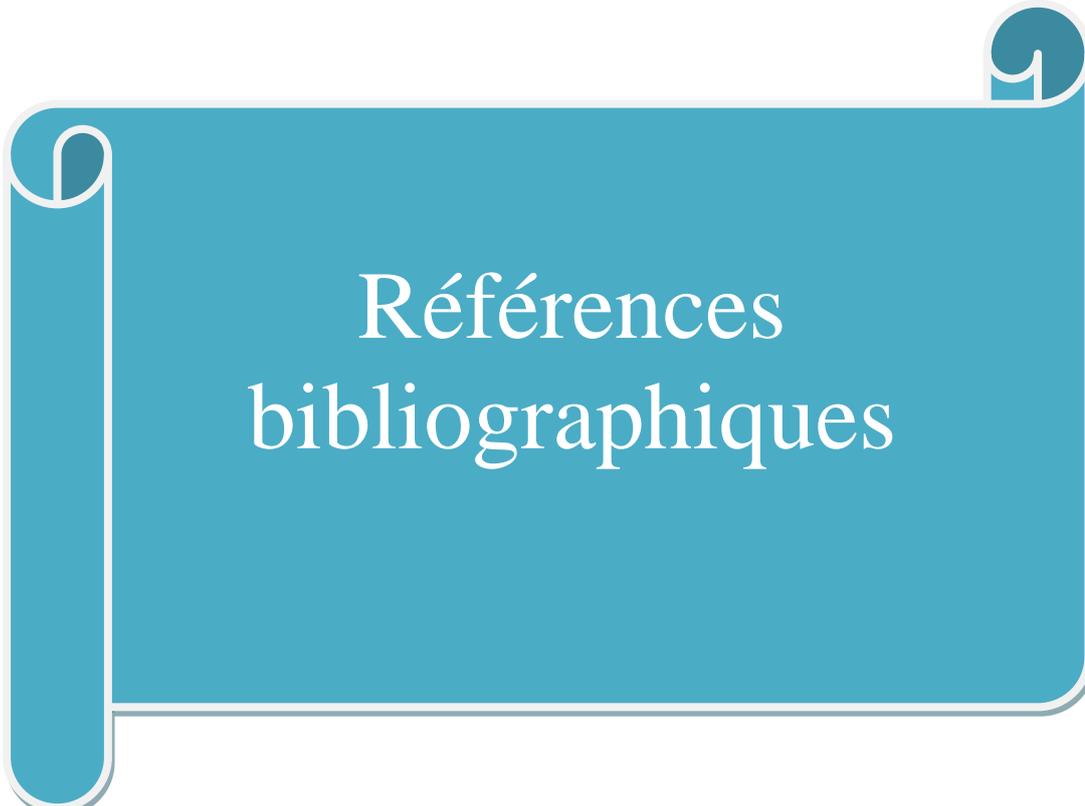
Dans ce travail nous nous sommes intéressés à optimiser et valider un procédé d'extraction liquide-liquide des deux conservateurs PHBM et PHBP à partir d'un sirop reconstitué à base d'alpha-amylase.

L'objectif scientifique de ce travail est dans un premier temps d'étudier l'influence de pH, volume de la phase aqueuse prélevé et aussi le type de solvant sur le rendement d'extraction de PHBM et PHBP. Nous avons pour cela utilisé les plans d'expérience dont l'objectif est d'optimiser les niveaux de facteurs étudiés pouvant influencer le procédé d'extraction, cette méthodologie nous a permis une meilleure planification des essais d'extraction et l'obtention d'un maximum d'informations pour un minimum d'expériences.

Les résultats d'analyse du modèle mathématique pour le plan composite centré montrent clairement qu'il est bien ajusté pour le PHBM et PHBP. La modélisation des réponses par le logiciel modde6 nous a permis de constater que les meilleurs résultats pour un rendement optimal sont obtenus aux pH égale à 4, le volume aqueux prélevé est de 1 mL et le meilleur solvant été le diéthyl-éthér.

La finalité de notre étude a été de valider la méthode de dosage des deux conservateurs présent dans le sirop d'alpha-amylase, et ce par Chromatographie Liquide à Haute Performance en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outil de décision de la validation : démarche harmonisée proposée par une commission de la SFSTP publiée en 2006 dans la revue STP Pharma Pratique qui consiste à évaluer l'exactitude d'une manière globale au lieu de mesurer les critères statistiques séparément.

Selon les résultats obtenus la méthode de dosage par Chromatographie Liquide à Haute Performance de PHBM et PHBP en association après leur extraction est jugé valide, ils attestent la spécificité, l'exactitude, la fidélité, la linéarité de la méthode et donc sa validité ; et elle peut être utilisé en routine par les laboratoires de contrôle qualité pharmaceutique en toute confiance.



Références
bibliographiques

Références Bibliographiques

- [1] Pharmacopée européenne, Vie éd. Janvier .2008.
- [2] A.Hir, J.-C. Chaumeil, D. Brossard. Pharmacie galénique bonne pratiques de fabrication des médicaments. 9e édition. 2009.
- [3] Hir.A : pharmacie galénique, bonnes pratiques de fabrication des médicaments, MASSON,8ème édition, 2006.
- [4] Zoubiri Lamia. Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes, Université Mentouri-ConstantineE Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA).2012
- [5] Haman Camille. Les parabènes dans l'eau:introduction dans l'environnement, occurrence et toxicité. Université de lorraine.2014
- [6] Corre Ch., Dalvai J., Dampfhofer M., Lamberlin M., Terrasson R. Les parabènes : quelle problématique pour la santé publique. Ecole des hautes études en santé publique(EHESP).2009
- [7] Pzterson,G., D.Rasmussen, and K.Gustavson, Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. 2007, DHI Water and Environment. p. 252.
- [8] LindeR R., Les plans d'expériences un outil indispensable à l'expérimentateur. Presses de l'école nationale des ponts et chaussées, 2005.Paris.
- [9] M. Fadil, A. Farah, B. Ihssane, T. Haloui, S. Rachiq. Optimisation des paramètres influençant l'hydro-distillation de Rosmarinus officinalis L par la méthodologie de surface de réponse, J. Mater. Environ. Sci. 6 (8) (2015) 2346-2357.
- [10] I. Yahiaoui. Les plans d'expériences Initiation à la construction et l'analyse des plans factoriels complets à deux niveaux et du plan composite centré. Université A. MIRA - Bejaia Faculté de Technologie Département de Génie des Procédés 2014/2015.
- [11] Cote,G. ''Extraction liquide-liquide''.Techniques de l'Ingénieurs : J 2760, (1998)
- [12] C.Poitrenaud, « Extraction liquide-liquide », Technique d'Ingénieur,P1425.
- [13] Djellouli Della Siham. Extraction et séparation des acides lactique et tartrique par solvants-diluants. Universite Hassiba Ben Bouali de chlef.2009

Références Bibliographiques

- [14] Jack Zheng. Formulation and Analytical Development for Low-Dose Oral Drug Products. 1ère édition; 2009.
- [15] Jeanne Mager Stellman. Encyclopédie de sécurité et de santé au travail. 3^{ème} édition. 2000.
- [16] Groupe de travail « GT Val 2 » coordonné par Michel Laurentie. Guide de validation des méthodes d'analyses. ANSES. Agence nationale de sécurité sanitaire; 2015.
- [17] ISO/CEI 17025:2005(fr), Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais [Internet]. [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v2:fr>
- [18] J-C Bouvier et Laboratoire du SGVC. Validation globale d'une méthode d'analyse globale d'une méthode d'analyse quantitative à partir de son profil d'exactitude.
- [19] Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2003. Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. STP Pharma Pratiques. 2003, 13, 3, 101-138.
- [20] Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. CPMP/ICH/381/95.
- [21] Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. CPMP/ICH/381/95.,
- [22] SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives. Juin 1992.
- [23] Umetrics AB, MODDE Pro, Version 6, MKS Datav Data Analytics Solutions, Umeå 2001.
- [24] S. Touzouirt, C. Limani, F. Oukaci, T. Ahmed Zaïd, M. Nabiev. Optimisation de la stabilité d'une émulsion de Pickering H/E à l'aide de la méthodologie des surfaces de réponses, the canadian journal of chemical engineering, 95, 1, 77–82. 2016.
- [25] STP PHARMA – VALANA-2003-PART I Final.pdf.
- [26] Jusstine MUSSARD. Les parabens, des conservateurs omniprésents un risqué pour la santé, 2006

Références Bibliographiques

- [27] Philippe TRIBOULET. Notions de bases sur les plans d'expériences. 2008
- [28] Pharmacopée britannique 2007 – version électronique (CD-ROM)
- [29] Cynthia K. Brown, Hitesh P. Chokshi, Beverly Nickerson, Robert A. Reed, Brian R. Rohrs, and Pankaj A. Shah. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compound; Pharmaceutical Technology 2004.
- [30] David B. Troy. Remington The science and practice of pharmacy 21^{ème} édition 2005.
- [31] Isabelle Pinguet. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015. <dumas-01188779>.
- [32] Validation de Méthodes | CQS Experts [Internet]. [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: <https://www.cqs-experts.fr/laboratoire-validation-de-methodes/>
- [33] Huguette Fabre, professeur. laboratoire de chimie analytique , faculté de pharmacie Montpellier, méthodologie de transfert d'une méthode d'analyse pour l'industrie pharmaceutique.
- [34] Georges Mahuzier; et al. Abrégé de chimie analytique. Tome II, Méthodes de séparation. 2^e éd. rev. et augm. 1999.
- [35] Inczedy J., Lengyel T., Ure A.M., IUPAC, Compendium of Analytical Nomenclature – 3rd edition. s.l. : Blackwell Science, 1998, 264 pages
- [36] Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2006. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II. Statistiques. STP Pharma Pratiques. 2006, 16, 1, 30-60.
- [37] Rouessac F, Rouessac A. Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes. Paris: Dunod; 2004.
- [38] Laurentie M. Compléments sur la quantification des résultats, pondération et transformation IN : validation des méthodes d'analyses quantitatives par le profil d'exactitude]. 2010 [cité 6 mars 2018]. p. 61.69. Disponible sur: https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/content/download/3290/31795/version/1/file/45_Feinberg_valid.pdf

Références Bibliographiques

- [39] Feinberg M. Mise en oeuvre du profil d'exactitude. In: Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude [Internet]. 2010 [cité 6 mars 2017]. p. 27–44
- [40] Bouabidi A. Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques. Faculté des Sciences Ben Casablanca; 2013.
- [41] Rozet E ., Hubert C., Ceccato A ., et al., Using tolerance intervals in prestudy validation of analytical methods to predict in-study results. The fit-for-future purpose concept. Journal of Chromatography A. 2007, 1158, 126-137.
- [42] Scoog S, West W, Holler H. Chimie Analytique. 7ème Ed. de boeck;
- [43] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Bonnes pratiques de fabrication, Edition 2007
- [44] P. Wehlé. Assurance qualité et bonnes pratiques de fabrication. In : Pharmacie galénique, formulation et technologie pharmaceutique. Maloine, 2007. p : 1-26.
- [45] E. Levacher et collaborateurs . De la qualité pharmaceutique. In : Pharmacotechnie industrielle , 2ème édition IMT Editions, 2006. p : 1-18. In.

Références Bibliographiques



ANNEXES

ANNEXE 1 : Généralités sur les conservateurs antimicrobiens

1. Qualités requises d'un conservateur

Aucun conservateur ne remplit tous les critères d'un système idéal. En pratique, on utilise des associations de conservateurs. [8]

Si le conservateur idéal existait, il devrait présenter les critères suivants :

- **Innocuité** : Le conservateur doit être dénué de tout effet toxique, irritant, sensibilisant, au niveau de la peau ou des membranes muqueuses.
- **Spectre d'activité** : Le conservateur doit présenter un large spectre d'activité. Il doit être efficace contre les bactéries Gram+ et Gram-, les levures et les moisissures.
- **Solubilité dans l'eau** : Les micro-organismes se multiplient en phase aqueuse ; il est donc important que le conservateur se maintienne à concentration efficace dans la phase hydrophile du produit.
Idéalement, un conservateur doit posséder une grande solubilité en phase aqueuse et une basse solubilité dans la phase grasse, donnant ainsi un coefficient de partage ou de répartition huile/eau faible (K).
-Si $K < 1$, le conservateur aura un caractère hydrophile marqué.
-Si $K > 1$, le conservateur aura un caractère lipophile marqué. [26]
- **pH de la formulation** : La plupart des bactéries se développent à un pH neutre ou proche de la neutralité, contrairement aux levures et moisissures pour lesquelles un pH acide (de 3 à 6) semble idéal.
- **Propriétés physiques** : Le conservateur idéal devrait être incolore, inodore et insipide dans le produit fini.
- **Volatilité** : Les conservateurs devraient être non-volatiles, évitant une perte d'activité que ce soit pendant la fabrication ou durant son usage.

ANNEXE 1 : Généralités sur les conservateurs antimicrobiens

- **Compatibilité** : Il faut considérer la compatibilité du conservateur avec le processus de fabrication, ainsi qu'avec les matériaux de conditionnement.
- **Stabilité** : Les conservateurs devraient être hautement stables vis-à-vis de la température, l'air, l'humidité, la lumière, l'eau, le pH...
- **Coût** : Un conservateur doit être rentable, facilitant ainsi son utilisation sur une base commerciale peu onéreuse [7]

2. Mécanismes d'action des conservateurs

Nous distinguons deux mécanismes d'action, suivant le type de conservateur antimicrobien utilisé. [8]

- Les conservateurs bactéricides tuent directement les bactéries : c'est une action dite irréversible.
- Les conservateurs bactériostatiques inhibent la multiplication des bactéries. C'est une action dite réversible car ils ne tuent pas les micro-organismes.

ANNEXE 2 : Méthodologie des plans d'expériences

1. L'intérêt des plans d'expériences

Les plans d'expériences sont utilisés dans les études industrielles en recherche-développement. Ils interviennent dans de nombreux domaines industriels. On peut notamment citer : [27]

- Industries chimiques, pétrochimiques et pharmaceutiques
- Industries mécaniques et automobiles

Leur utilisation vise aux buts suivants : [27]

- Détermination des facteurs clés dans la conception d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé,
- Optimisation des réglages d'un procédé de fabrication ou d'un appareil de mesure,
- Prédiction par modélisation du comportement d'un procédé
- Les plans d'expériences s'inscrivent dans une démarche générale d'amélioration de la qualité,
- Minimiser le cout d'obtention d'une information fiable : faire le minimum d'essais et obtenir le maximum de précision sur les résultats visés [9]

2. Méthodologie dans l'étude d'un Phénomène

Lors de l'étude d'un phénomène, plusieurs questions se posent, auxquelles répondent différents types de plans. On peut distinguer 3 grandes étapes dans l'acquisition des connaissances :

- **Recherche des facteurs influents**
- **Modélisation**
- **Optimisation**

ANNEXE 2 : Méthodologie des plans d'expériences

➤ **La recherche des facteurs Influent**

Les plans qui permettent de rechercher les facteurs influents sont les plans factoriels complets ou fractionnaires.

➤ **La modélisation**

Quand les facteurs influents ont été identifiés et leur importance quantifiée, on recherche ensuite l'équation permettant de décrire les variations de la réponse étudiée en fonction de celles des facteurs influents ; cette seconde étape constitue **la modélisation**. **Les plans factoriels** suffisent parfois. Il se peut dans d'autres cas que l'on soit obligé de faire appel à des plans plus complexes tels que **les plans composites centrés**. [28]

➤ **L'optimisation**

Déterminer les conditions expérimentales qui permettent d'obtenir le meilleur résultat pour la réponse.

Pour un système (industriel, de laboratoire...) dont l'état dépend de variables opératoires le terme **OPTIMISATION** désigne une action qui vise à trouver l'ensemble des valeurs de ces variables qui entraîne un état souhaité pour le système étudié.

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

1. Contexte réglementaire

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ICH, notamment la guideline ICH Q2 (R1) parue en 2005 : « Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ». Son but est de fournir des 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.

Cette guideline ICH est une exigence réglementaire, toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) doit répondre à ses exigences. Il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires, comme les guides de validation analytique de la SFSTP :

- **SFSTP** « Guide de validation analytique –Rapport d'une commission SFSTP »
 - I. Méthodologie, paru dans STP Pharma Pratique en 1992;
 - II. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Pratique en 1992;
- **SFSTP** « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : Stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Pratique en 1997;
- **SFSTP** « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »
 - I. Généralités, paru dans STP Pharma Pratique en 2003;
 - II. Statistiques, paru dans STP Pharma Pratique en 2006;
 - III. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Pratique en 2006;
 - IV. Exemples d'application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008. [26]

L'objectif d'une méthode d'analyse est de pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. C'est-à-dire que l'écart du résultat d'analyse et de la valeur vraie inconnue soit inférieur à une limite d'acceptation (λ) qui peut être variable selon les exigences de l'analyste (et/ou du client) et de la finalité de la méthode d'analyse. Il apparaît ainsi deux principes fondamentaux : la notion de limite d'acceptation des performances d'une procédure analytique et celle de la responsabilité de

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

l'analyste dans la décision d'accepter ou non une procédure en fonction de ses performances et de l'usage pour lequel elle est destinée [20].

2. Spécificité

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

- Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des quatre solutions précédemment préparées : les chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard 100% et l'échantillon 100% doivent renfermer des pics au même temps de rétention et avec des surfaces comparables et les chromatogrammes obtenus à partir du diluant et de la solution placebo ne doivent pas présenter un pic au même temps de rétention que l'analyte.
- Soit par la comparaison de la droite obtenue avec les standards de validation (avec 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 [22,29].

3. Fonction de réponse

Les mesures effectuées sur les SE permettent de déterminer la relation entre la réponse Y donnée par l'instrument et la concentration X des solutions. Cette relation est une fonction de type :

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

Avec ε , l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse. Cette fonction n'est pas nécessairement linéaire mais elle doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagé.

La fonction de réponse doit être ajustée, c'est-à-dire que ses paramètres doivent être évalués de telle sorte que l'erreur résiduelle ε soit minimisée.

La procédure SFSTP 2003-2006 propose d'appliquer le concept de « fitness-for-purpose » pour choisir la fonction de réponse la mieux adaptée pour la courbe d'étalonnage, et ainsi avoir un modèle d'étalonnage permettant de minimiser ε et donc de calculer les concentrations prédites les plus correctes possibles. Le Tableau XI illustre quelques exemples des différentes fonctions de réponse pouvant être envisagées lors d'une validation des méthodes analytiques.

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

Tableau 2. 55 : Exemple de fonctions de réponse

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

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 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.

Les paramètres des fonctions de réponse vont être estimés soit par la méthode des moindres carrés classique, soit par la méthode du maximum de vraisemblance, comme recommandé dans la procédure SFSTP 2003-2006. Pour l'ajustement de modèles non linéaires il est recommandé de recourir à des ouvrages de référence et d'utiliser des logiciels spécialisés.

Après le calcul des erreurs résiduelles ; Les variances résiduelles aux différents niveaux de concentrations, le test Cochran est appliqué pour vérifier l'homogénéité des variances. En comparant la variation résiduelle maximale à la somme des erreurs résiduelles. Si une hétérogénéité des variances est observée, une stabilisation de la variance est envisageable pour corriger le manque de proportionnalité entre la variance et la concentration :

- Soit avec une transformation mathématique : par exemple, le logarithme népérien ou la racine carrée pourrait être appliqué à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y. Il est cependant recommandé de n'appliquer ce type de transformation qu'avec les modèles linéaires du tableau ;

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

- Soit en appliquant une pondération, Ceci implique de donner un poids à chaque niveau de concentration. Quatre cas sont généralement observés :
 - Il n’y a pas de relation entre la concentration et la variance (le cas idéal) : le poids $W_i = 1$. En d’autre terme, il n’y a pas de nécessité de pondérer.
 - La variance varie avec une relation de type $1/X$ i.e. inversement proportionnelle à la concentration, le poids qui doit être pris en compte est de la forme $W_i = 1/C$.
 - La variance varie selon une relation de type $1/X^2$ i.e. inversement proportionnelle au carré de la concentration, le poids à utiliser est de la forme $W_i = 1/C^2$
 - La relation n'est pas une relation simple entre la concentration et la variance, chaque variance variant indépendamment du niveau de concentration, le poids $W_i = 1/S^2$ avec S^2 la variance observée à chaque niveau de concentration.[29,30–31].

4. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour des raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu’un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire).

Cela consiste à transformer les réponses observées ($Y_{ijk} \rightarrow Y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne. Cet 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 les fonctions de réponse obtenues avec les standards d’étalonnage. Ainsi l’alignement des répétitions du niveau de concentration j de la série i s’effectue comme suit :

$$y_{ijk,c} = y_{ijk} + f(\bar{x}_{ijj}) - f(x_{ijk})$$

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse [30] :

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

Tableau 2. 56: Règles d’alignement pour différentes fonctions de réponses

Fonction de réponse	Règle d’alignement
Droite passant à l’origine	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]^2$
Fonction logistique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[\frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{y}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{y}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right]$

5. Prédiction inverses

Pour les méthodes indirectes, les modèles d’étalonnage servent à déduire les concentrations calculées, à partir des données du plan de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d’étalonnage, selon le modèle mathématique suivant :

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

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y par les y_{calc} (la valeur de y alignée sur la moyenne des x).

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse. Le tableau XII fournit ces équations selon la fonction de réponse choisie au tableau XI.[30]

Tableau 2.57: Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse[30]

Type	Equation
droite passant par l’origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

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

6. Calcul de la justesse et de la fidélité

6.1. Modèle

L'estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode s'effectue avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation (ou des standards d'étalonnage eux-mêmes en phase de pré-validation). Cette estimation est réalisée à chacun des j niveaux de concentration considérés à l'aide du modèle statistique suivant :

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

Où

- X_{ijk} est la $k^{\text{ième}}$ concentration calculée du niveau j de la $i^{\text{ème}}$ série,
- μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j ,
- α_{ij} est au niveau j l'écart entre la moyenne de la $i^{\text{ème}}$ série et la moyenne μ_j ; α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{B,j}$.
- ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{r,j}$

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

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

La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres μ_j , $\sigma^2_{B,j}$ et $\sigma^2_{r,j}$ du modèle.[34]

La norme ISO 5725 ne prend en compte que les plans d'expérience où le nombre de répétitions K par série est le même pour toutes les séries (plan équilibré). Le nombre total de répétitions doit être égal à $I \times K$ (I est le nombre de séries). Par contre, ce total peut être différent pour chaque niveau. [30]

Calculer la moyenne générale d'un niveau :

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

$$\hat{\mu}_j = \bar{x}_{j,calc} = \frac{1}{I \times K} \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^K x_{ik,calc}$$

Calculer les écarts-types de répétabilité, inter-séries et de fidélité intermédiaire en effectuant l'analyse de la variance (ANOVA) d'un modèle à effet aléatoire, selon les principes décrits de la norme ISO 5725, à savoir une décomposition de la somme des carrés des écarts totaux en deux sommes des carrés d'écarts (l'indice j de niveau n'est pas noté pour cause de simplification) : [30]

$$\underbrace{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^I (x_{ik,calc} - \bar{x}_{i,calc})^2}_{SCE_t} = \underbrace{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^I (x_{ik,calc} - \bar{x}_{k,calc})^2}_{SCE_r} + \underbrace{\sum_{k=1}^K I \times (\bar{x}_{ik,calc} - \bar{x}_{i,calc})^2}_{SCE_B}$$

Cette équation est traditionnellement écrite sous une forme abrégée, faisant appel à trois sommes de carrés d'écarts (SCE).

$$SCE_t = SCE_B + SCE_r$$

Où chacune des sommes est définie comme suit pour faciliter l'interprétation :

- SCE_t : Somme totale des écarts à la moyenne générale du niveau
- SCE_B : Somme des écarts inter-séries (due à la variance du biais)
- SCE_r : Somme des écarts intra-série (due à la variance résiduelle)

Comme le propose la norme ISO 5725, il n'est pas nécessaire de développer les trois sommes de carrés pour effectuer les calculs ; le calcul de SCE_B se fait par différence. Cette méthode peut poser des problèmes si le résultat est négatif : forcer alors la valeur de SCE_B . [30],[32]

$$SCE_B = SCE_t - SCE_r \text{ si } SCE_B > 0$$

$$SCE_B = 0 \text{ si } SCE_B \leq 0$$

Calculer la variance de répétabilité du niveau, Variance intra-série notée $\hat{\sigma}_r^2$ à partir des répétitions $x_{ijk,calc}$:

$$\hat{\sigma}_r^2 = \frac{SCE_r}{I(K-1)}$$

Calculer la variance inter-séries notée $\hat{\sigma}_B^2$, comme suit :

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

$$\hat{\sigma}_B^2 = \frac{\frac{SCE_B}{I-1} - \hat{\sigma}_r^2}{K}$$

6.2. 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. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites [30],[32], comme suit :

$$\begin{aligned} \text{Biais}_j &= \hat{\mu}_j - \bar{x}_j \\ \text{Biais } (\%)_j &= \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \times 100 \\ \text{recouvrement } (\%)_j &= \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \times 100 \end{aligned}$$

\bar{x}_j : Moyenne des concentrations introduites

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

6.3. Fidélité

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. [30],[32]

L'écart-type de répétabilité : $\hat{\sigma}_r$

L'écart-type de fidélité intermédiaire du niveau : $\hat{\sigma}_{FI} = \sqrt{\hat{\sigma}_r^2 + \hat{\sigma}_B^2}$

7. Calcul de l'exactitude

L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui de la méthode analytique) exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure :

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

Pour chaque modèle et chaque observation l'exactitude de la mesure en valeur relative est donnée comme suit :

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

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

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre déjà l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats [30],[32]

8. Calcul de l'intervalle de tolérance

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats calculés que nous obtenions avec l'erreur totale, mais plutôt une 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 $\mu_j, \hat{\sigma}_{B,j}$ et $\hat{\sigma}_{r,j}$ à chaque niveau de concentration j a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observations dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$, c'est-à-dire :

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{ P_x [|X - \mu_T| < \lambda] | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M \} \geq \beta$$

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation et pour chaque modèle mathématique. [30]

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

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{P_x[\hat{\mu}_M - Q_t \hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + Q_t \hat{\sigma}_M | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M]\} = \beta$$

Où :

$$\hat{\sigma}_{FI,j}^2 = \hat{\sigma}_{r,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$$

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

$$B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}}$$

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+1/K)^2}{I-1} + \frac{1-1/K}{I \times K}}$$

$Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$ Le quantile de la distribution t de Student pour v degrés de liberté et β la probabilité.

Le même intervalle en échelle relative devient :

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

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 $[-\gamma, \gamma]$ définies a priori en fonction des objectifs de la méthode. [30]

9. Le profil d'exactitude

Selon l'équation ci-dessous, les bornes de ces intervalles sont :

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

$$L_j (\text{borne supérieure}) = \text{biais}(\%)_j - Q_t \left(v; \frac{1 + \beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,J}}$$

$$U_j (\text{borne inférieure}) = \text{biais}(\%)_j + Q_t \left(v; \frac{1 + \beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,J}}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles

($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$) [32]

10. Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vus que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues, sachant que le coefficient de détermination R^2 ne renseigne pas sur la qualité des résultats.

Le profil d'exactitude, qui est le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de juger l'adéquation de différentes pratiques et permet de prendre des décisions sur le choix de la fonction de réponse adéquate.[30]

11. Linéarité

La linéarité de la méthode de dosage est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation. 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 $[y = f(x)]$, pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les standards d'étalonnage. Dans un deuxième temps, la linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées (x_{calc}) et les concentrations introduites (x) est évaluée en représentant graphiquement la fonction $[x_{calc} = f(x)]$ pour les trois séries de validation conjointement. Une analyse statistique de la droite obtenue est effectuée, la pente est comparée à la valeur de référence 1, l'ordonnée à l'origine est comparée à la valeur de référence 0, et une vérification de l'ajustement est effectuée [33].

ANNEXE 3 : Démarche statistique de la validation analytique

12. Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de mesures attendues, permet donc de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition, quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LQ_{inf}) et haute (LQ_{sup}) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie.[30]

Principaux avantages et inconvénients d'un procédé d'extraction

1. Avantages

- Le coût : ce sont des techniques qui ne demandent pas d'investissement de gros matériel ou de réactifs. Le matériel nécessaire à la mise en œuvre de ces techniques est du matériel de base de laboratoire comme de la verrerie, des pipettes, une centrifugeuse et une hotte à solvants. [34]
- Permet de travailler à basse température (séparation de produit thermosensible) ;
- Permet la séparation de produits ayant des volatilités très proches (cas des isomères) ;
- Les équipements peuvent être compacts et très performants ;
- Les expérimentations au laboratoire sont faciles ;
- Il demande moins d'énergie que la distillation dans le cas de la récupération de produits lourds (à point d'ébullition élevé).

2. Inconvénients

- Ce sont des techniques manuelles, consommatrices de temps et de personnel car peu automatisables.
- Procédé plus récent que la distillation et la littérature est moins abondante ;
- Difficultés d'extraire les molécules très polaires de part les caractéristiques chimiques des solvants organiques (apolaire et aprotiques).
- La toxicité des solvants : les solvants sont des produits toxiques dont il faut se protéger par le port de gant adaptés (nitrile), de lunettes, et qui nécessitent des manipulations sous une hotte. [34]

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

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 en phase liquide 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. Actuellement grâce aux procédés de fabrication, il est possible d'obtenir des phases stationnaires de granulométrie fine et régulière. Ceci présente l'avantage d'accroître la surface d'échange. Parallèlement à la présence de pompe, capables de distribuer la phase mobile sous pression élevée [35]. 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...) [36].

1. Principe

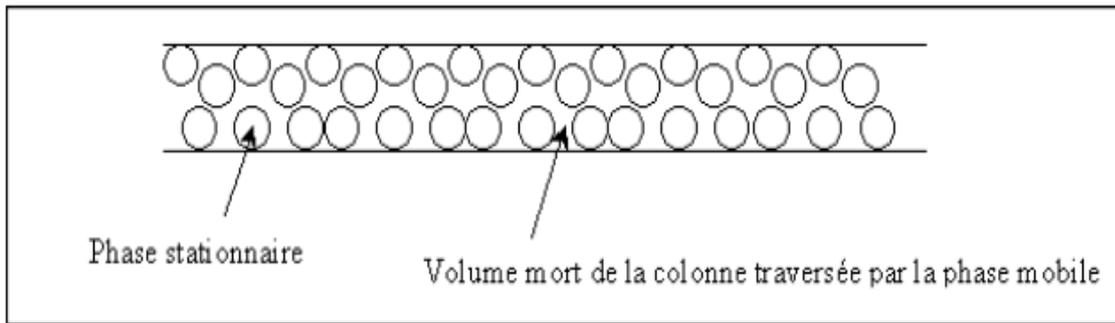
Les composés à analyser (solutés) sont mis en solution et entraînés par une phase mobile liquide (éluant) tout au long d'une phase stationnaire pour être séparés grâce à une répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (partage, adsorption...) exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le 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 représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [36].

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

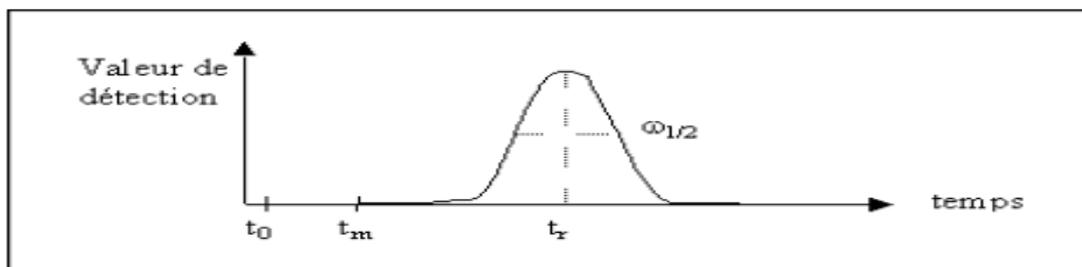
1. Notions fondamentales



La phase stationnaire: est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés

La phase mobile ou éluant : est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.

1.1. Notion de temps



- **Le temps mort t_m :** est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).
- **Le temps de rétention t_r :** est le 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 donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.
- **Le temps de rétention réduit t'_r :** est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit

$$t'_r = t_r - t_m$$

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

2.2. Notion de concentration

- **Le coefficient de partage K**

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 fonction de 3 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire
- Celle entre les phases mobile et stationnaire

- **Le facteur de capacité K'** est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et 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

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

3. Appareillage

L'appareillage utilisé doit être capable de supporter les pressions élevées imposées par la très fine granulométrie des phases stationnaires. Il est pour cela en acier inoxydable résistant à la corrosion chimique des phases mobiles liquides [37].

Représenté schématiquement dans la figure 20 ; il comprend essentiellement :

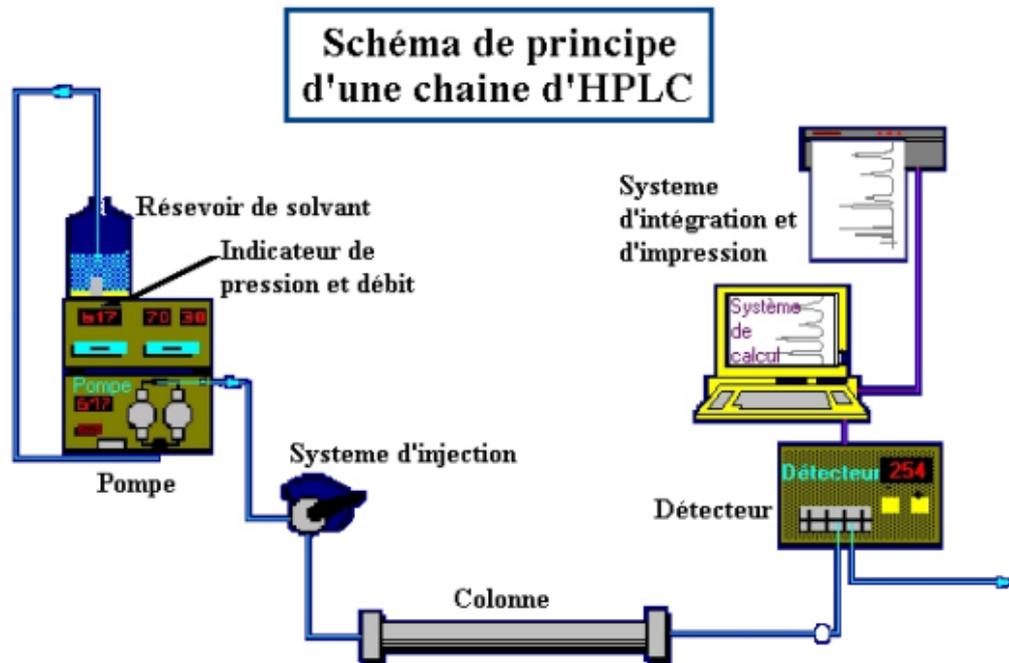


Figure 2.21: schéma d'une chaîne d'HPLC

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

3.1. Réservoir

Ces réservoirs contiennent la phase mobile en quantité suffisante. Ils sont étanches afin d'éviter l'évaporation ou contamination des solvants, équipés également de dispositifs (barbotage d'azote ou agitateurs magnétiques) qui ont pour but de chasser les gaz dissous [37].

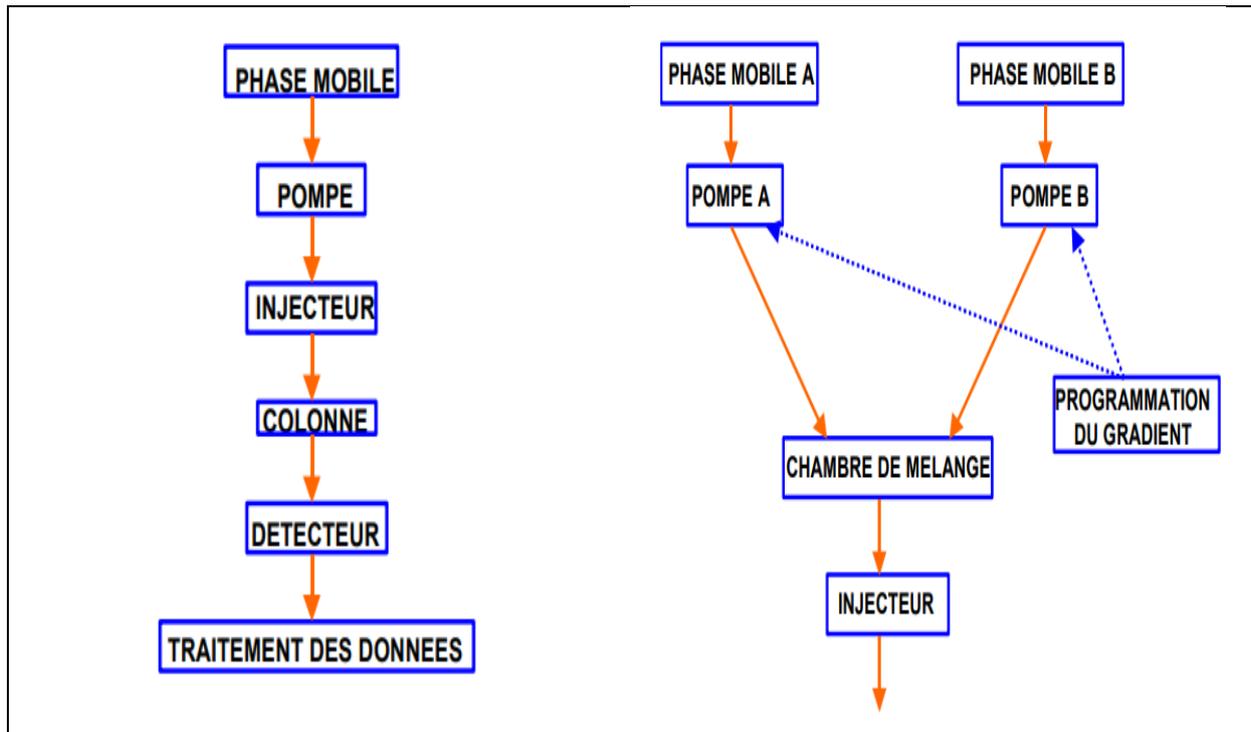
Le nombre de solvants utilisés dans la phase mobile est limité à 4 solvants : méthanol, tétrahydrofurane, eau, acétonurie ; tous ces solvants sont caractérisés par :

- Une faible viscosité ;
- Une disponibilité avec une pureté élevée ;
- Une bonne miscibilité les uns avec les autres ;
- Une bonne transparence en UV .

Ces solvants doivent être de « qualité HPLC », ce qui permet de garantir leurs degrés de pureté [38].

3.1.1. Régime isocratique

La phase mobile conserve pendant toute la chromatographie la même composition (figure21), elle est donc préalablement préparée et disposée dans un seul réservoir [37].



3.1.2. Régime en gradient d'éluion

La phase mobile est obtenue en mélangeant instantanément plusieurs solvants provenant de différents réservoirs [37]. Cette technique du gradient d'éluion permet souvent de séparer des solutés qui ne pourraient pas l'être par éluion isocratique même avec un mélange de solvant (figure2); elle est particulièrement efficace quand les constituants de l'échantillon présentent des polarités très différentes [49].

3.2. Système de pompage

Toute installation de HPLC comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) selon le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire.

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie. Ces pompes débitométriques comportent généralement deux pistons en série fonctionnant en opposition pour éviter les interruptions de débit dues au remplissage du cylindre. Le déplacement des pistons est contrôlé par un moteur pas à pas associé à une came de forme particulière [40].

On distingue deux sortes de pompes : les pompes à pression constante et les pompe à débit constant [37].

3.3. Injecteurs

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne. Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 30 000 kPa. Elle fonctionne en deux temps :

- Dans la position *chargement*, où seule la communication entre pompe et colonne est assurée, l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle. Celle-ci, dont il existe tout un choix de volumes, est soit extérieure, soit intégrée dans le corps de la vanne.

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

- Dans la position injection, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60 ° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle [40].

3.4. Colonnes

Les colonnes utilisées en HPLC se caractérisent par leur géométrie et par la nature des phases stationnaires qu'ils contiennent.

Les colonnes analytiques ont des longueurs moyennes de 10 à 25cm, et les diamètres sont de 1 ; 4 ; 6 et 8 mm. [37]

Les appareils actuels permettent de thermostatier la colonne et l'éluant, à la fois pour assurer la répétitivité des analyses et pour faire intervenir éventuellement la température comme paramètre de séparation [40].

3.4.1. Phases stationnaires

Ces phases sont essentiellement constituées par des fines particules poreuses (silice ou alumine). Elles peuvent également être recouvertes par des imprégnations.

3.4.1.1. La phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations [41].ou greffages :

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

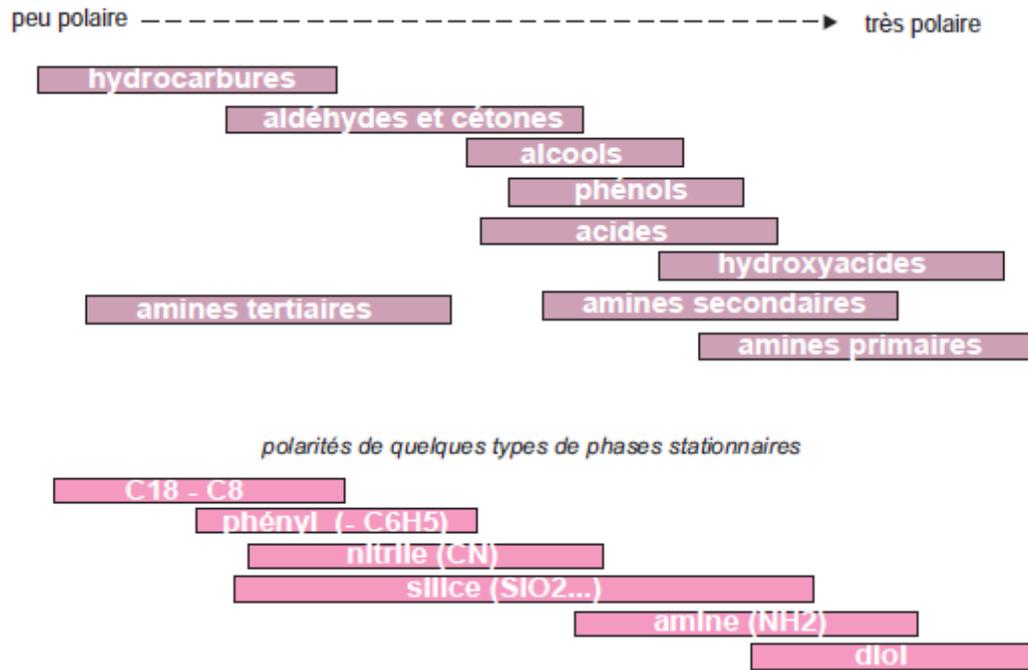


Figure 2.2 : polarités de quelques phases stationnaires

3.4.1.2. La phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire (figure3) et nécessite donc un éluant polaire (Acétonurie, Méthanol, eau). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante [41].

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.

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

- **UV-Visible**

Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne. La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer :

$$A = \epsilon_{\lambda}lc$$

L'absorbance A de la Phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde λ ou plusieurs longueurs. D'onde dans l'UV ou le visible. La phase mobile ne doit pas, ou très peu, absorber par elle-même [40].

Il existe plusieurs 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...

3.6. Intégrateur

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres : La largeur attendue des pics et le seuil d'intégration (sensibilité) [40].

4. Analyse du chromatogramme

Une bonne séparation se traduit par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits [439].

4.1. Analyse qualitative

4.1.1. Information apportée par le tracé chromatographique

4.1.1.1. Grandeurs fondamentales

- « ω » : Largeur du pic à la base (à 13.5% de la hauteur du pic);

- « δ » : Largeur à mi-hauteur ;

- « h » : hauteur du pic chromatographique ;

- « A » : Surface de la courbe [42]

4.1.1.2. Grandeurs de rétention

- Temps de rétention t_R : le temps écoulé entre l'instant de l'injection du soluté et celui correspondant sur le chromatogramme au maximum du pic ;

- Temps mort t_0 ou t_M : le temps nécessaire à l'éluant non retenu pour qu'il arrive au détecteur ;

- Temps réduit : est défini par la différence entre les deux temps précédents ;

$$t'_R = t_R - t_0$$

- Volume de rétention : volume de la phase mobile nécessaire à entrainer la substance jusqu'au détecteur ;

Une correction tenant compte du volume mort de la colonne V_M est généralement appliquée ; définissant le volume de rétention corrigé $V_{R'}$;

$$V_{R'} = V_R - V_M$$

- Facteurs de rétention k' :

C'est le rapport entre la quantité de soluté se trouvant dans la phase stationnaire et celle se trouvant dans la phase mobile [33].

$$K' = KD \frac{V_s}{V_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Plus le k' est grand, plus le composé est retenu longtemps dans la colonne et le pic est élargi [42].

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

4.1.1.3. Efficacité de la colonne

Elle se traduit par la finesse des pics obtenus pour les composés, plus le pic est fin plus la colonne est efficace, elle est exprimée par deux grandeurs [42].

- Nombre de plateaux théoriques N :

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} = 5.54 \frac{t_R^2}{\delta^2}$$

- La hauteur équivalente d'un plateau théorique :

$$H = \frac{L}{N}$$

(Avec L : longueur de la colonne)

L'efficacité de la colonne augmente lorsque le nombre de plateau théoriques augment ou si H diminue à longueur L constante [43].

4.1.1.4. Sélectivité

C'est une mesure de l'efficacité du processus de séparation intervenant à l'interface entre les phases, dans le cas de deux solutés ; pour qu'il y ait une séparation il faut que la valeur de k' de chaque soluté soit différente, on peut donc définir un facteur de séparation (sélectivité) α par l'équation :

$$\alpha = \frac{k'1}{k'2} = \frac{t'_{R1}}{t'_{R2}}$$

Par convention, on choisit toujours les pics pour que l'on ait un α supérieur à 1. [39]

ANNEXE 5 : Chromatographie liquide à haute performance(HPLC)

4.1.1.5. Facteurs de résolution

En plus des interactions entre les solutés et chaque une des deux phases, d'autres mécanismes conduisent toujours à l'élargissement des pics. L'importance de cet élargissement est exprimée par la résolution R_s , de deux pics adjacents, défini en chromatographie par :

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0.5(\omega_1 + \omega_2)}$$

Une bonne séparation des pics à la base correspond à $R_s > 1.5$ [39].

4.2. Analyse quantitative

La chromatographie quantitative se base sur la comparaison de l'aire ou de la hauteur du pic de l'analyse avec celle d'un ou de plusieurs étalons. Si les conditions sont soigneusement contrôlées, ces deux paramètres varient linéairement avec la concentration [43], qui peut être déterminée par plusieurs méthodes principalement :

4.2.1. Etalonnage externe

Elle est basée sur la comparaison entre deux chromatogrammes (étalonnage et analyse) effectuées successivement dans des conditions chromatographiques identiques [42].

La source d'erreur la plus importante propre à cette méthode d'étalonnage est généralement liée à l'incertitude sur le volume d'échantillon (cette erreur est réduite par le système 'injection en boucle) [43].

4.2.2. Etalonnage interne

Dans cette méthode une quantité soigneusement mesurée d'un étalon interne est introduite dans chaque étalon et dans chaque échantillon. Le rapport de l'aire de l'analyte à l'aire de l'étalon interne constitue le paramètre analytique [43].

ANNEXE 6 : Tables des tests statistiques

Quantiles d'ordre 0.95 de la loi de Fisher

Degré de liberté du numérateur sur la première ligne

Degrés de liberté du dénominateur sur la colonne de gauche

Tableau 2.58 : Table de F-critique

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165

ANNEXE 6 : Tables des tests statistiques

La table donne la probabilité α pour que t égale ou dépasse en valeur absolue, une valeur donnée en fonction du nombre de degrés de liberté (ddl).

α ddl	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	5,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,142	0,815	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,013	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,718	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,706	1,108	1,397	1,850	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,259	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,895	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,685	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,681	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,675	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,416
120	0,126	0,677	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,675	1,037	1,282	1,645	1,960	2,327	2,577	3,283

Figure : Table de Student

Résumé

Les parabènes sont largement utilisés dans les industries pharmaceutiques. Dans l'ensemble, ces additifs ont un rôle bénéfique comme conservateurs antimicrobiens. Cette étude décrit l'optimisation et validation de parahydroxybenzoate de méthyle (PHBM) et parahydroxybenzoate de propyle (PHBP) en association dans le sirop reconstitué d'alpha-amylase en utilisant l'extraction liquide-liquide et la détection par la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Une méthodologie de surface de réponse (RSM) basée sur un design composite central (CCD) a été appliquée pour l'optimisation de la principale variable ont été optimisés, telles que le volume de la phase aqueuse, les solvants dispersifs, le pH qui affectent significativement l'efficacité et le rendement de l'extraction. La méthode d'analyse développée pour la première fois s'est révélé spécifique, linéaire, sensible, exacte un risque d'avoir au maximum de 5% des futures mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5, +5] %. Les travaux aboutis ont démontré que la méthode développée peut être utilisée avec succès dans la détermination simultanée des deux conservateurs (PHBM) et (PHBP) en association.

Mots-clés: Extraction liquide-liquide; détecteur de chromatographie liquide à haute performance (HPLC); Parahydroxybenzoate de méthyle; Parahydroxybenzoate de propyle; conception composite centrale ; validation analytique.

Abstract

Parabens are widely used in the pharmaceutical industries. Overall, these additives have a beneficial role as antimicrobial preservatives. This study describes the optimization and validation of methyl parahydroxybenzoate (PHBM) and propyl parahydroxybenzoate (PHBP) in combination in reconstituted alpha-amylase syrup using liquid-liquid extraction and detection by high-level liquid chromatography performance (HPLC). A surface response methodology (RSM) based on a central composite design (CCD) was applied for the optimization of the main variable were optimized, such as the volume of the aqueous phase, the dispersive solvents, the pH that affect significantly the efficiency and the yield of the extraction. The analysis method developed for the first time was found to be specific, linear, sensitive, accurate, with a risk of having a maximum of 5% of future measurements outside the acceptance limits set at [-5, +5] %. Successful work has shown that the method developed can be used successfully in the simultaneous determination of both preservatives (PHBM) and (PHBP) in combination.

Keywords: Liquid-liquid extraction; high performance liquid chromatography detector (HPLC); Methyl parahydroxybenzoate; Propyl parahydroxybenzoate; central composite design; analytical validation.



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

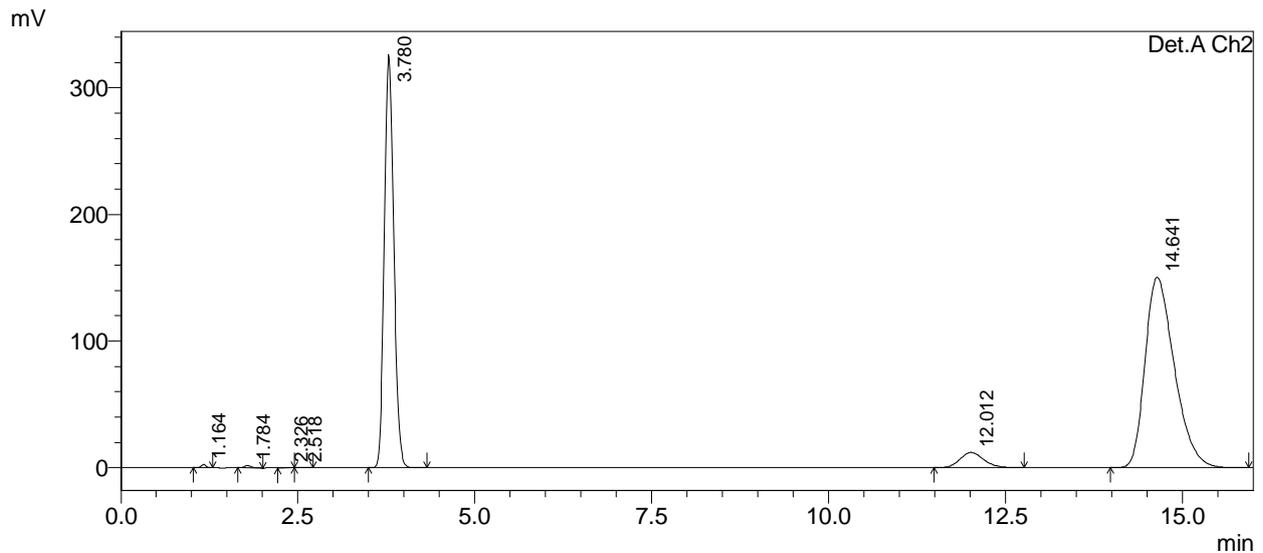
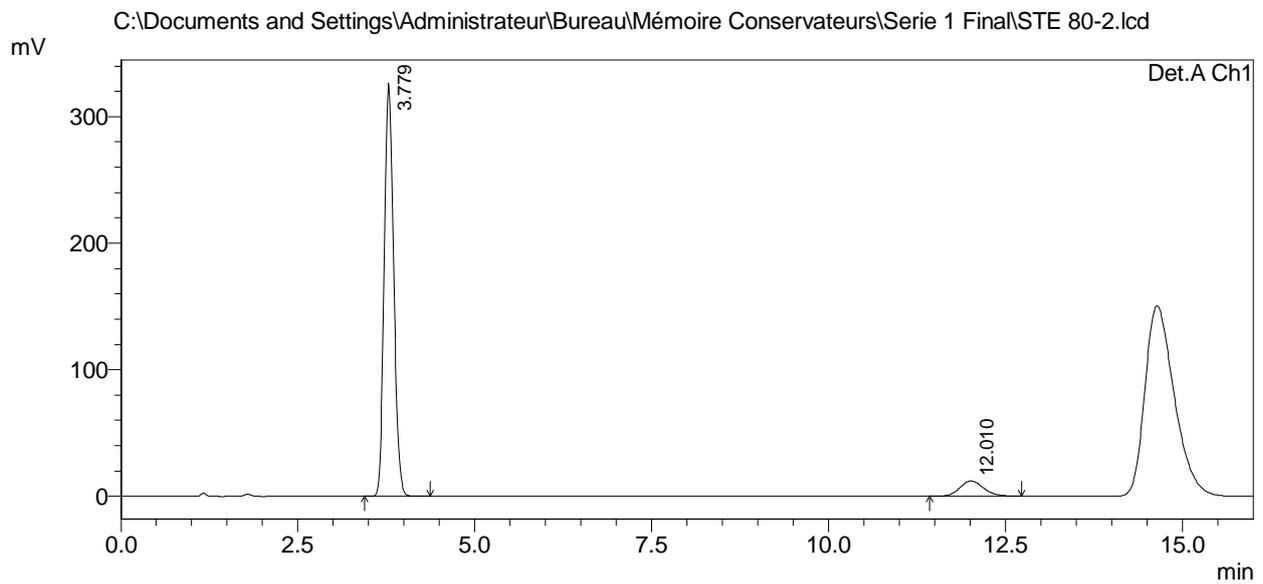
[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Resolution Analysis Report =====

C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\Mémoire Conservateurs\Serie 1 Final\STE 80-2.lcd

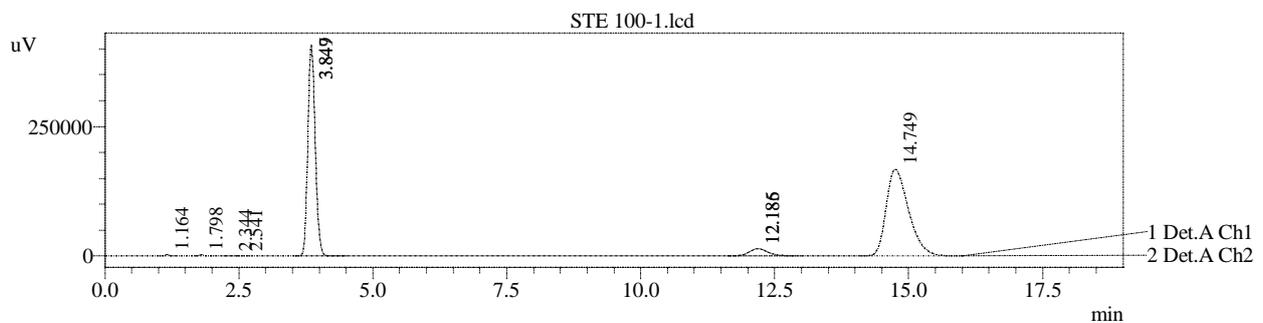
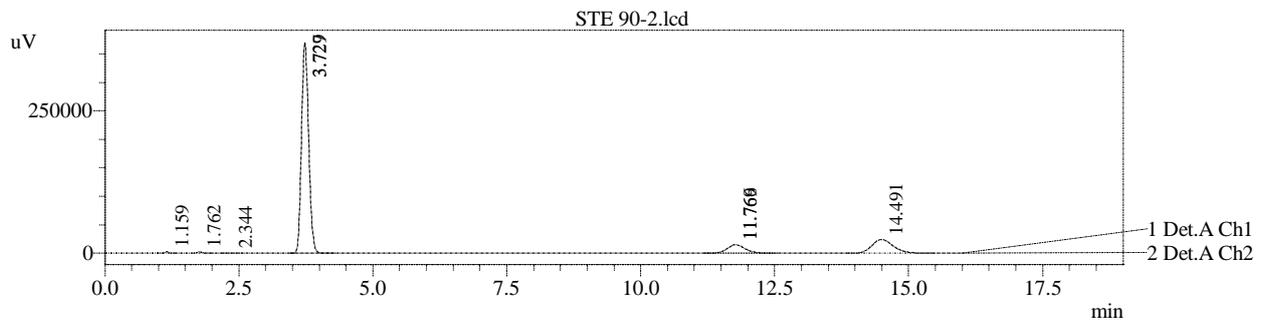
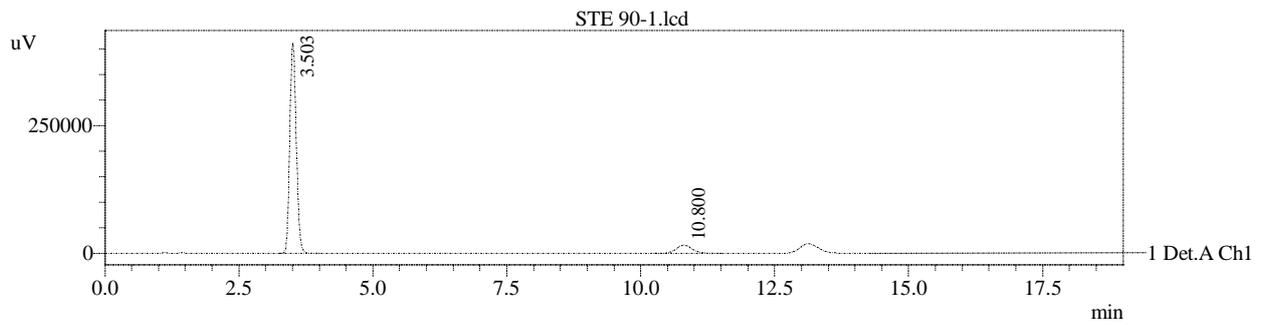
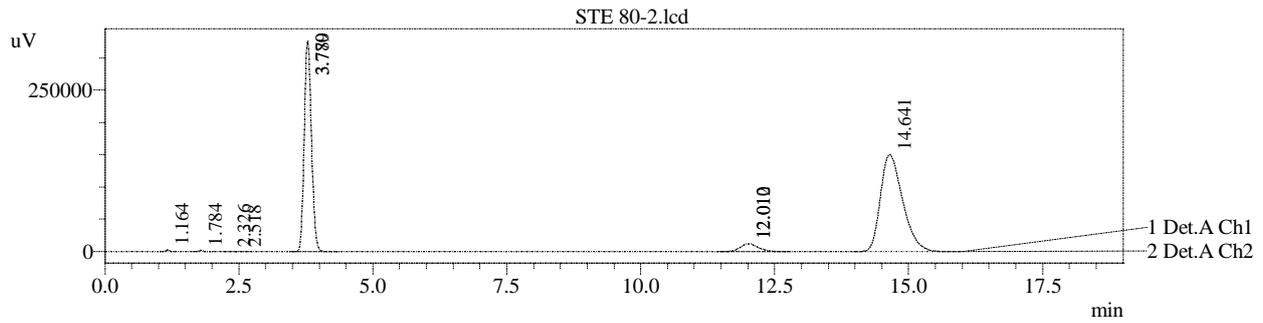
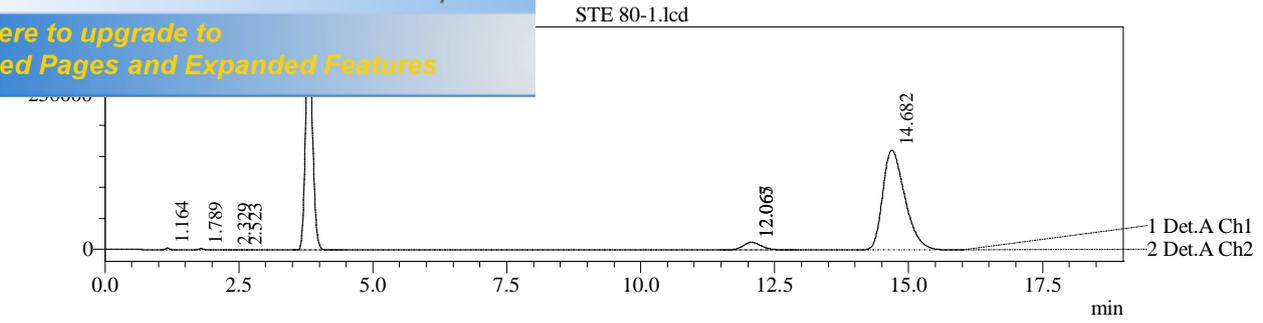
Acquired by : Admin
Sample Name : Serie 1
Sample ID : Standard
Tray# : 11
Vail # : 2
Injection Volume : 10 uL
Data File Name : STE 80-2.lcd
Method File Name : Conservateurs 1.lcm
Batch File Name : SEIRE 1.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 22/11/2006 07:54:01
Data Processed : 01/01/2006 19:15:05

<Chromatogram>



- 1 Det.A Ch1/272nm
- 2 Det.A Ch2/272nm

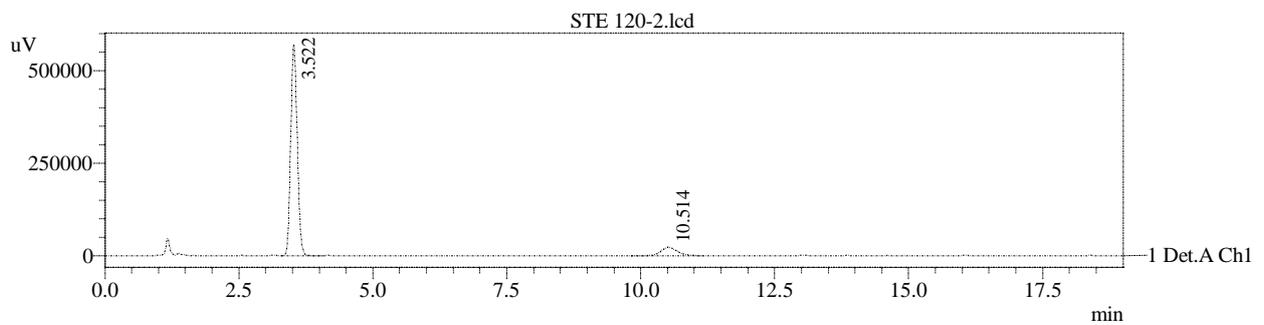
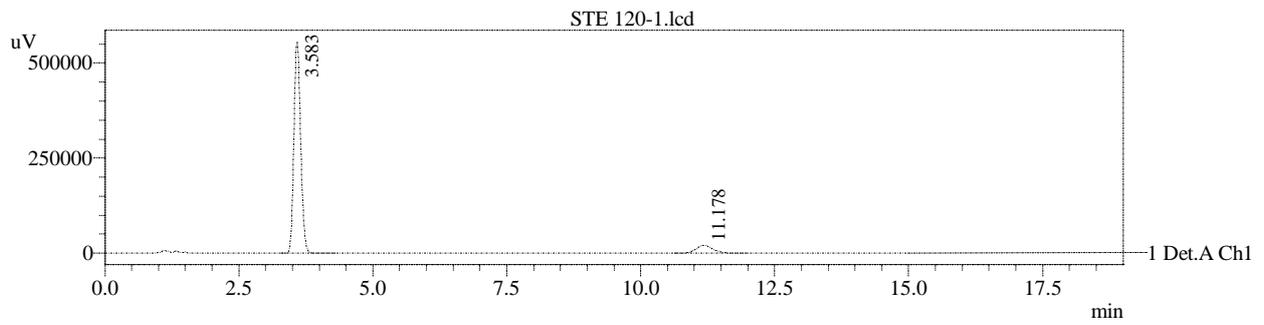
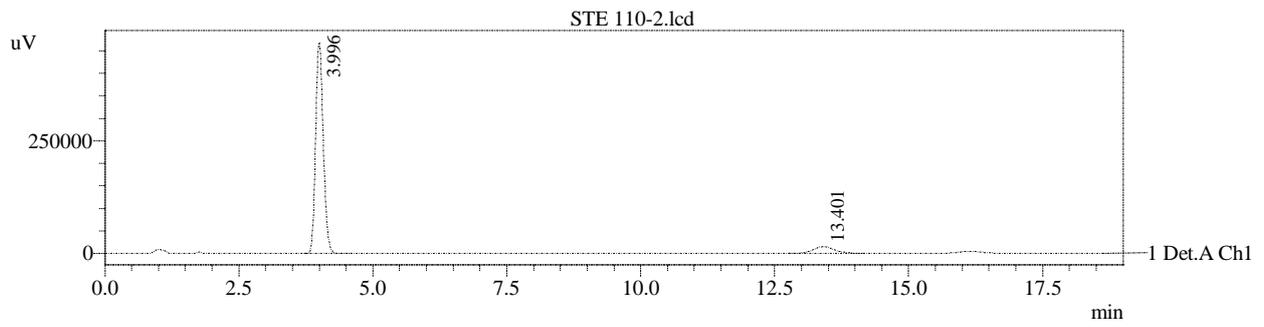
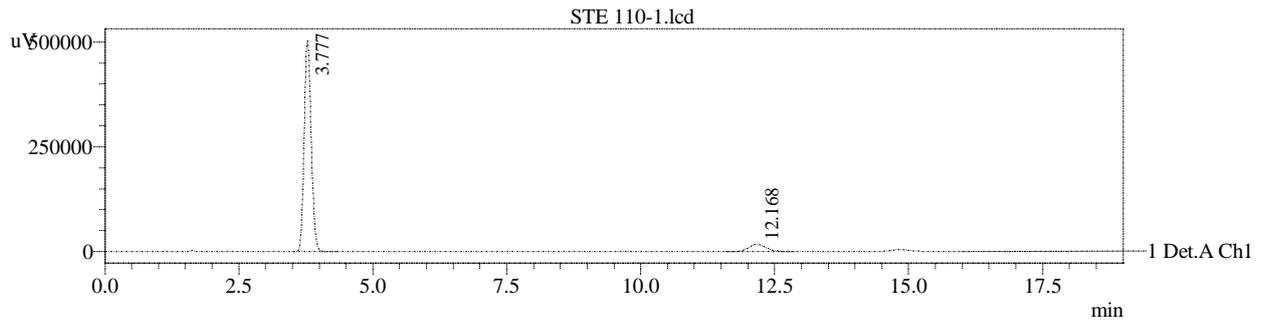
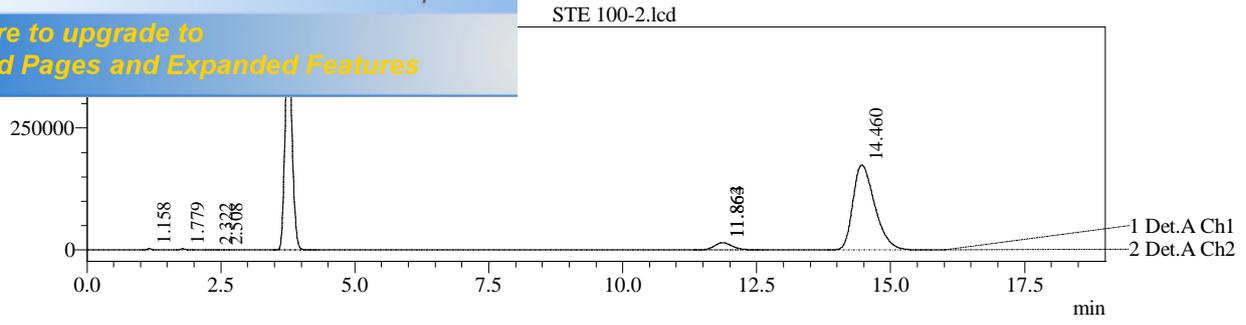
Summary(Compound)





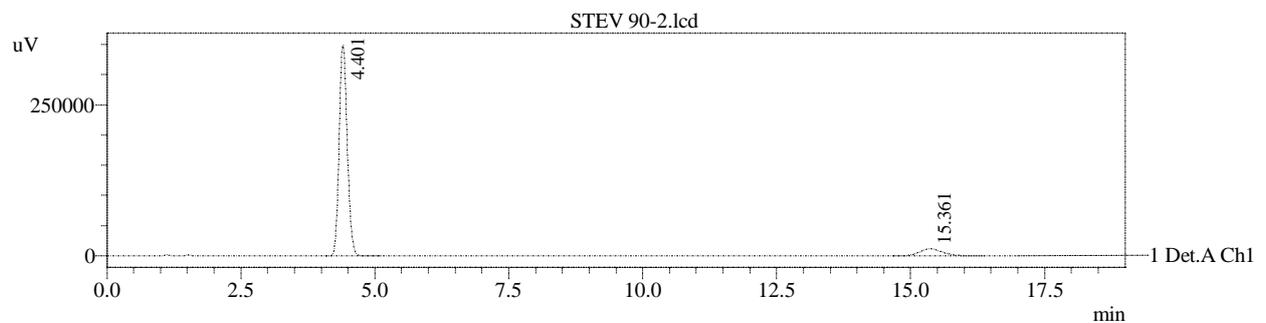
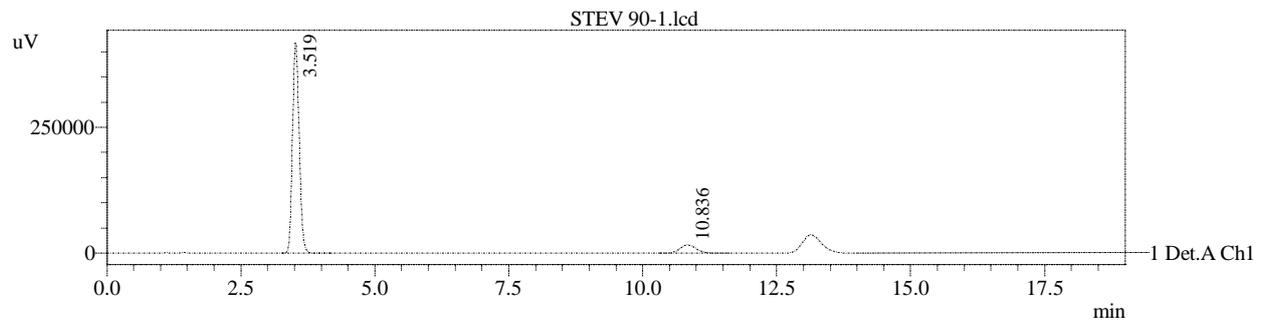
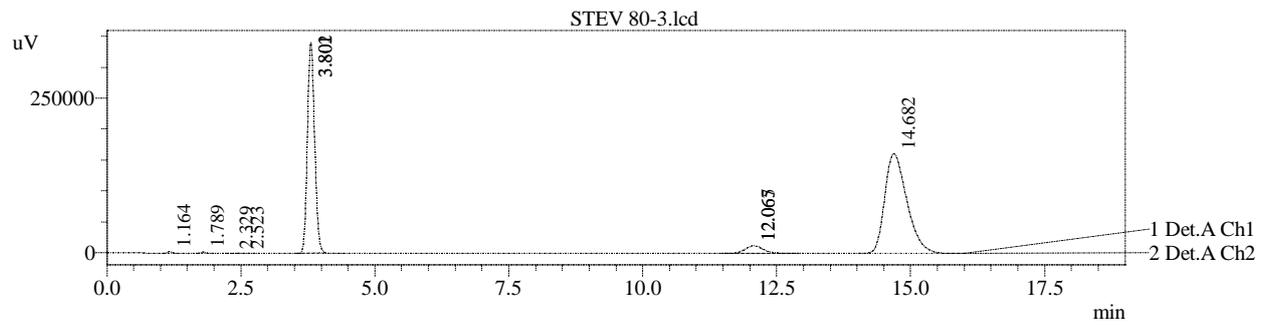
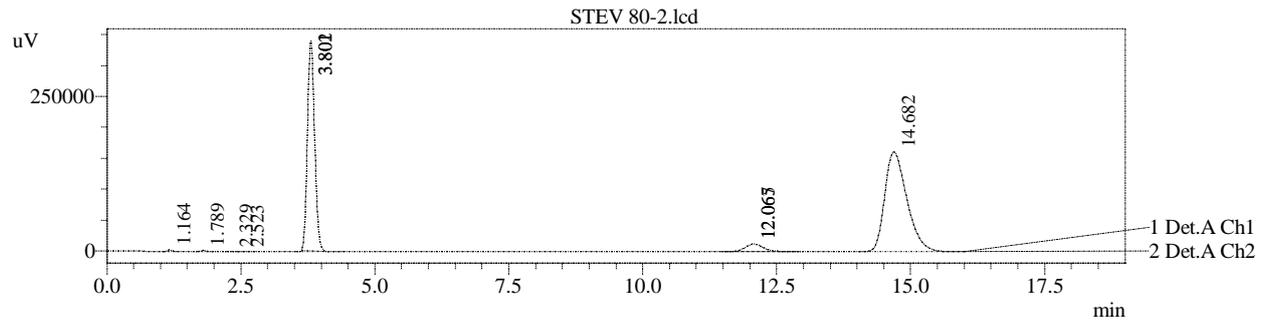
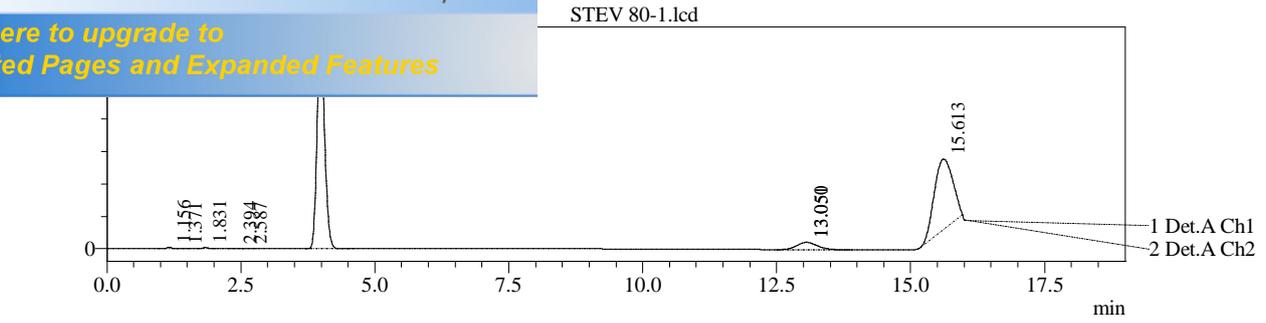
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.

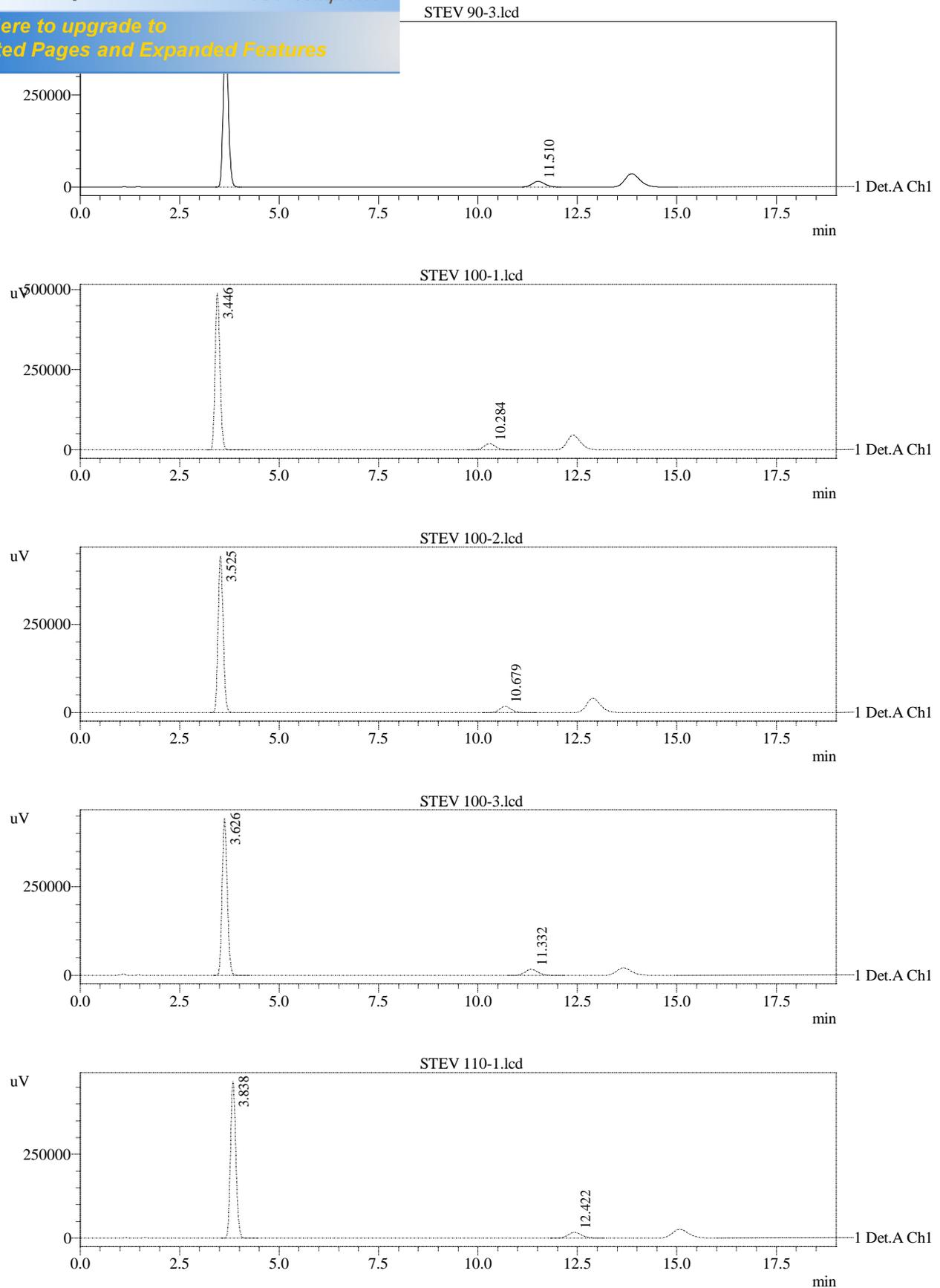
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)





PDF Complete
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

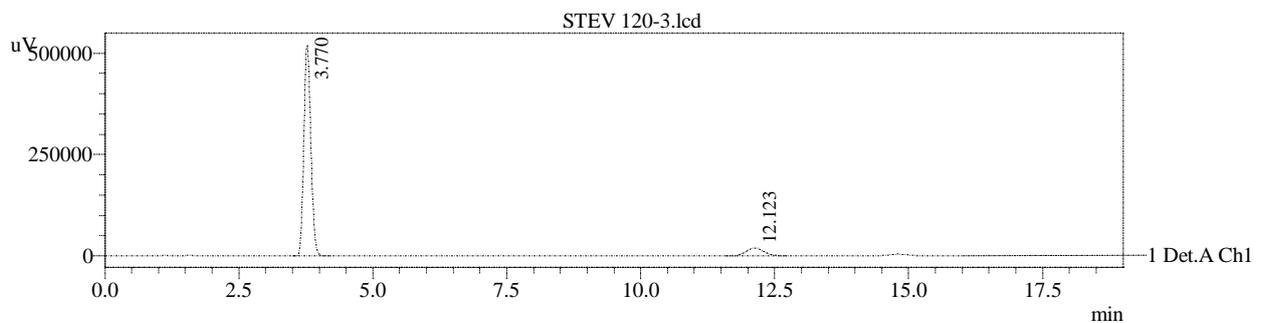
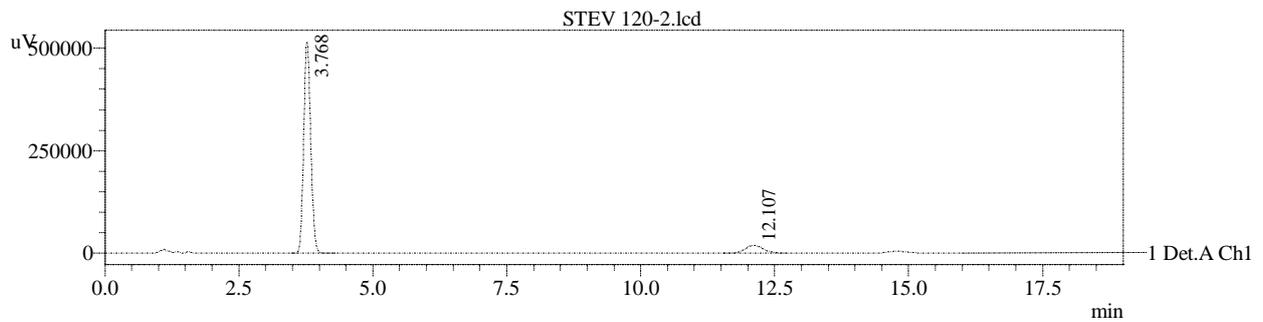
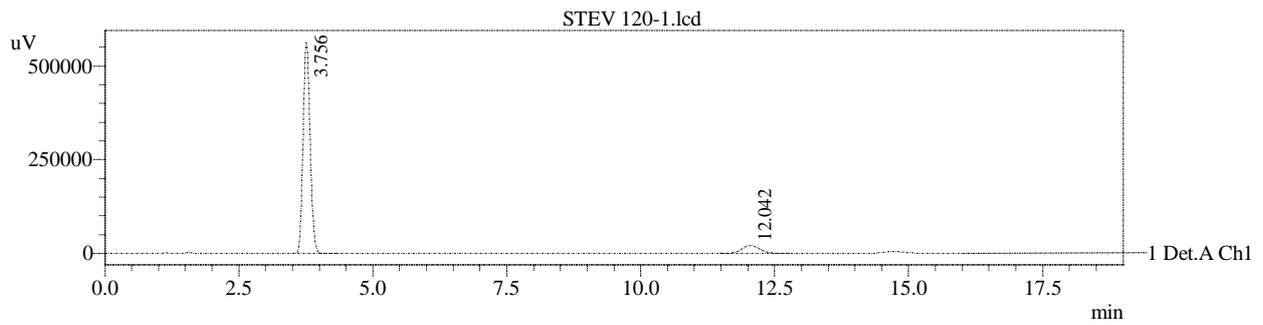
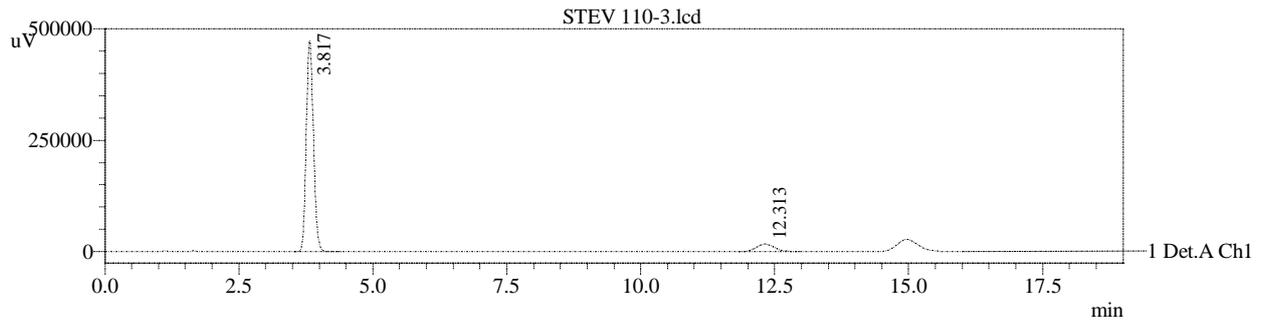
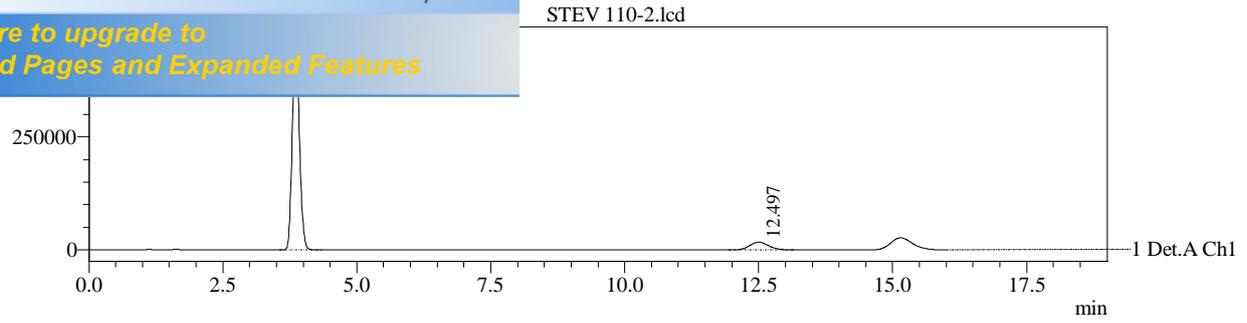






Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: PHBM

Title	Sample ID	Ret. Time	Area	Height
-------	-----------	-----------	------	--------



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

		Ret. Time	Area	Height
		3.801	3190330	340271
		3.779	3050904	326466
		3.503	3465215	412954
STE 90-2.lcd	Standard	3.727	3401813	370650
STE 100-1.lcd	Standard	3.847	3906011	407542
STE 100-2.lcd	Standard	3.754	4000898	432992
STE 110-1.lcd	Standard	3.777	4596740	502897
STE 110-2.lcd	Standard	3.996	4661776	468885
STE 120-1.lcd	Standard	3.583	4888062	554821
STE 120-2.lcd	Standard	3.522	4827053	568944
STEV 80-1.lcd	Standard	3.984	3249587	323457
STEV 80-2.lcd	Standard	3.801	3146943	338591
STEV 80-3.lcd	Standard	3.801	3177561	339959
STEV 90-1.lcd	Standard	3.519	3646824	418765
STEV 90-2.lcd	Standard	4.401	3670637	349240
STEV 90-3.lcd	Standard	3.652	3798964	424820
STEV 100-1.lcd	Standard	3.446	4128689	488165
STEV 100-2.lcd	Standard	3.525	3921673	443120
STEV 100-3.lcd	Standard	3.626	3977172	442363
STEV 110-1.lcd	Standard	3.838	4359939	467412
STEV 110-2.lcd	Standard	3.853	4373024	467207
STEV 110-3.lcd	Standard	3.817	4404029	473403
STEV 120-1.lcd	Standard	3.756	5114881	562386
STEV 120-2.lcd	Standard	3.768	4680975	514659
STEV 120-3.lcd	Standard	3.770	4738839	520249
Average		3.754	4015142	438409
%RSD		5.283	15.602	17.343
Maximum		4.401	5114881	568944
Minimum		3.446	3050904	323457
Standard Deviation		0.198	626451	76033

ID#2 Compound Name: PHBP

Title	Sample ID	Ret. Time	Area	Height
STE 80-1.lcd	Standard	12.065	289228	12331
STE 80-2.lcd	Standard	12.010	286172	12108
STE 90-1.lcd	Standard	10.800	332124	15954
STE 90-2.lcd	Standard	11.766	337602	14625
STE 100-1.lcd	Standard	12.185	328999	13889
STE 100-2.lcd	Standard	11.863	343970	14907
STE 110-1.lcd	Standard	12.168	406900	17409
STE 110-2.lcd	Standard	13.401	408766	14968
STE 120-1.lcd	Standard	11.178	446058	20447
STE 120-2.lcd	Standard	10.514	504628	23267
STEV 80-1.lcd	Standard	13.050	301130	11376
STEV 80-2.lcd	Standard	12.065	289228	12331
STEV 80-3.lcd	Standard	12.065	289228	12331
STEV 90-1.lcd	Standard	10.836	341835	16083
STEV 90-2.lcd	Standard	15.361	350780	11769
STEV 90-3.lcd	Standard	11.510	334554	15240
STEV 100-1.lcd	Standard	10.284	388787	19324
STEV 100-2.lcd	Standard	10.679	357066	17267
STEV 100-3.lcd	Standard	11.332	380744	17035
STEV 110-1.lcd	Standard	12.422	417615	17399
STEV 110-2.lcd	Standard	12.497	415798	17273
STEV 110-3.lcd	Standard	12.313	401424	17003
STEV 120-1.lcd	Standard	12.042	492580	21303
STEV 120-2.lcd	Standard	12.107	441934	19185
STEV 120-3.lcd	Standard	12.123	451112	19538
Average		11.945	373531	16174
%RSD		8.721	17.093	19.830
Maximum		15.361	504628	23267
Minimum		10.284	286172	11376
Standard Deviation		1.042	63847	3207