

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOULOU MAMMERI TIZI-OUZOU



Faculté des sciences  
Département de chimie  
Mémoire de master II en chimie  
Specialité :Chimie Pharmaceutique

Présenté par :

Melle CHERIFI Celia

Mme OULD MAHAMED Assia

## Thème

Mise au point et validation d'une méthode de dosage du  
lactulose dans un produit fini sirop par  
spectrophotométrie UV/Visible

Soutenu publiquement le 03/07/2014 devant le jury composé de :

Mme AYATI F.	MCA	UMMTO	Présidente
Mme ABERBACHE	Gérante EURL TSPPA/enseignante associée à UMMTO		Examinatrice
Melle TOUZOUIRT	MAA	UMMTO	Examinatrice
Mr MAMOU	MAHU	UMMTO	Encadreur

Promotion: 2013/2014

## *Remerciements*

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements au Dr MAMOU pour tout le temps qu'il nous a consacré, ses directives précieuses, et pour la qualité de son suivi durant toute la période de notre stage, merci pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de diriger ce travail.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de notre profonde reconnaissance pour votre disponibilité et notre sincère admiration pour votre compétence.

Nos profonds remerciements vont également à tout le personnel du laboratoire de chimie analytique du département pharmacie de la faculté de médecine de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou pour leur gentillesse et leur soutien.

Nous remercions les membres de jury pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Soyez assurés de notre sincère gratitude.

Nos plus vifs remerciements s'adressent aussi à tout le cadre professoral et administratif du département de chimie de la faculté des sciences de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou.

Nos remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

## *Je dédie ce mémoire*

*A mes très chers parents pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

*A mes sœurs Amel et Leticia pour toute l'affection qu'elles me donnent et pour leurs précieux encouragements.*

*A ma nièce Darine, ma plus grande source de bonheur, j'espère que la vie lui réserve le meilleur.*

*A mon amie Assia pour tous ces beaux moments de complicité et d'amitié qu'on a partagés durant ces deux dernières années.*

Celia

Je dédie ce modeste travail ;

A ma fille hanane

Tu es tout pour moi ma chérie, j'ai fait ça rien que pour toi, je t'aime mon lapin.

A mon mari

Tu seras toujours cette lumière nous guidant à travers les sombres chemins. Tu es source de vie et de réconfort. Toi seul sais désaltérer le pèlerin assoiffé  
Merci d'avoir toujours été présent à mes côtés  
Que ce travail soit néanmoins la preuve de toute mon affection

A ma mère

Qui représente tous ce qui est beau dans ce monde  
Merci pour tout, je t'aime.

A ma famille et ma belle famille

Considérez ce travail comme le symbole de l'aboutissement de mes études et mon départ dans la vie.

Soyez assurés de ma profonde reconnaissance pour tout l'amour que vous m'avez donné.

A la mémoire de mon père et mon grand père.

A mon binôme

Ces mois passés en ta charmante compagnie resteront sans doute gravés dans mon cœur.

Assia

## *Liste des abréviations :*

**AFNOR** : Association française de normalisation  
**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché  
**BPF** : Bonne Pratique de Fabrication  
**C** : carbone  
**C°** : Celsius  
**Ca(OH)<sub>2</sub>**: Hydroxyde de calcium  
**d** : densité  
**D**: droite  
**DCI** : Dénomination Commune Internationale  
**Ech** : échantillon  
**Fig**: figure  
**FR** : Forme reconstituée.  
**g**: gramme  
**h** : heure  
**H**: hydrogène  
**H<sup>+</sup>**: ion hydrogène  
**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: Acide sulfurique  
**HCl**: Acide chlorhydrique  
**ICH**: International Conference on Harmonization  
**ISO**: International Standard Organization  
**IUPAC**: International Union of Pure and Applied Chemistry  
**KOH**: Hydroxyde de potassium  
**m** : masse  
**m** : mètre  
**max** : maximum  
**min** : minutes  
**ml**: millilitre  
**mm hg**: millimètre de mercure  
**mol**: moles  
**MP** : Matière première.  
**N°** : numéro  
**NaOH**: Hydroxyde de sodium

**NH<sub>3</sub>**: Ammoniac

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**: Ammonium

**nm** : nanomètres

**NS** : non significatif

**O**: Oxygène

**p.ex.**: par exemple.

**PA** : principe actif

**PF** : Produit fini.

**pH** : Potentiel d'Hydrogène

**S** : significatif

**SFSTP** : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutique.

**UV**: Ultra-violet

**VIS** : visible

## *Paramètres statistiques :*

**a** : Pente de la droite de régression linéaire.

**b** : Ordonnée à l'origine de la droite de régression.

**C** : Test de Cochran.

**CV** : Coefficient de Variation.

**D** : Droite de régression linéaire.

**F** : Test de Fisher.

**i** : Indice des valeurs individuelles dans le groupe j.

$I_{Rm}$  : Intervalle de confiance de recouvrement moyen  $R_m$ .

**j** : Indice de groupe.

**k** : Nombre de groupes.

$\bar{m}$  : Moyenne des moyennes des groupes.

$m_j$  : Moyenne de  $n_j$  valeurs du groupe j.

$\bar{n}$  : Nombre moyen de valeurs par groupe.

$n_j$  : Nombre d'observations du groupe j.

**N** : Nombre total d'observations  $y_{ij}$  dans l'ensemble des k groupes.

**NDL** : Nombre de degré de liberté.

$\bar{NDL}_j$  : Nombre de degré de liberté du groupe j.

**p** : Seuil de probabilité.

**r** : Coefficient de corrélation.

**R<sub>m</sub>** : Taux de recouvrement moyen

**S** : Ecart type estimé de n valeurs.

**S<sup>2</sup>** : Variance.

**S<sup>2</sup> max** : Variance la plus élevée des k groupe j

**S<sup>2</sup><sub>E</sub>** : Variation intra-groupe

**S<sub>b</sub>** : Ecart type de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire

**S<sub>g</sub><sup>2</sup>** : Variance inter-groupes

**S<sub>I</sub><sup>2</sup>** : Variation due à la régression

**S<sub>j</sub><sup>2</sup>** : Variance du groupe j.

**S<sub>r</sub><sup>2</sup>** : Variance de répétabilité

**S<sub>R</sub><sup>2</sup>** : Variance totale

**S<sub>R</sub><sup>2</sup>** : Variation résiduelle

**S<sub>T</sub><sup>2</sup>** : Variation totale

**S<sub>xij</sub> y<sub>ij</sub>** : Covariance des variables  $x_{ij}$  et  $y_{ij}$

**S<sub>xij</sub>** : Ecarts types respectifs des variables  $x_{ij}$

**S<sub>yij</sub>** : Ecarts types respectifs des variables  $x_{ij}$  et  $y_{ij}$

**t** : t de Student

$\bar{\bar{X}}$  : Moyenne des valeurs  $x_{ij}$  des k groupes

$x_{100}$  : Concentration à la solution de référence

$X_{ij}$  : Quantité retrouvée

$x_{ij}$  : Valeur brute indépendante

$\bar{X}_j$  : Moyenne des valeurs  $x_{ij}$  du groupe j

$\bar{Y}_j$  : Moyenne des observations  $y_{ij}$  des k groupes.

$\bar{\bar{Y}}$  : Recouvrement moyen

$y'_{ij}$  : Valeurs estimées

$y_{100}$  : Observation à la solution de référence

$\gamma_{ij}$  : Pourcentages de recouvrement

$y_{ij}$  : Valeur brute dépendante

$\bar{\bar{y}}_j$  : Moyenne des observations  $y_{ij}$  dans chaque groupe j

$\alpha$  : Risque

## *Liste des figures :*

<b>Figure 1</b> : Structure du lactulose.....	2
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique du mécanisme général de l'action du lactulose sur la santé humaine .....	4
<b>Figure 3</b> : Conversion du lactose en lactulose par le réarrangement de Lobry de Bruyn-van Ekenstein .....	6
<b>Figure 4</b> : Conversion du lactose en lactulose par le réarrangement d'amadori ..	6
<b>Figure 5</b> : Obtention d'un furfural ou dérivé dans un milieu acide et à chaud .....	8
<b>Figure 6</b> : Réaction de Selivanoff.....	9
<b>Figure 7</b> : Spectre électromagnétique.....	10
<b>Figure 8</b> : Représentation d'une cuve traversée par un faisceau incident d'intensité $I_0/\lambda$ . Un faisceau d'intensité $I/\lambda$ en émerge .....	11
<b>Figure 9</b> : Protocole expérimental permettant l'optimisation de la longueur d'onde .....	22
<b>Figure 10</b> : Protocole expérimental permettant d'optimiser la concentration en résorcinol.....	24
<b>Figure 11</b> : Protocole expérimental de l'optimisation de la concentration standard .....	26
<b>Figure 12</b> : Protocole expérimental pour le dosage de lactulose standard (linéarité) .....	30
<b>Figure 13</b> : Protocole expérimental de dosage de lactulose dans la forme reconstituée .....	31
<b>Figure 14</b> : Démarche statistique de l'étude de la linéarité .....	32
<b>Figure 15</b> : Protocole expérimental de fidélité.....	39
<b>Figure 16</b> : Spectre d'absorbances en fonction de la longueur d'onde pour le complexe réactionnel : résorcinol 0.05%/ standard 1 .....	47
<b>Figure 17</b> : Spectre d'absorbances en fonction de la longueur d'onde pour le complexe réactionnel : résorcinol 1%/ standard 2 .....	47
<b>Figure 18</b> : Absorbances à 410nm en fonction des concentrations en résorcinol pour standard 1 et standard 2.....	48
<b>Figure 19</b> : Absorbances à 485nm en fonction des concentrations en résorcinol pour standard 1 et standard 2 .....	49
<b>Figure 20</b> : Courbe linéaire des absorbances en fonction de la concentration standard dans le domaine (0.01 -1) mg/ml .....	51
<b>Figure 21</b> : Droite d'étalonnage sur le standard.....	53
<b>Figure 22</b> : Droite d'étalonnage sur forme reconstituée. (Fait par le logiciel Origin 8.0) .....	54

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1</b> : Propriétés physiques, chimiques et organoleptiques du lactulose ...	3
<b>Tableau 2</b> : Résumé des principales caractéristiques des méthodes actuellement utilisées pour la production du lactulose .....	7
<b>Tableau 3</b> : Résumé des critères de validation et type d'analyse .....	16
<b>Tableau 4</b> : Effet de la dégradation de la solution résorcinol sur le résultat final .	27
<b>Tableau 5</b> : Teneur de la solution échantillon en PA.....	29
<b>Tableau 6</b> : Test de l'existence d'une pente significative .....	36
<b>Tableau 7</b> : Test de validité de la droite de régression.....	36
<b>Tableau 8</b> : Test de validité des moyennes.....	38
<b>Tableau 9</b> : Ensemble d'étapes combinatoires permettant l'étude de la robustesse .....	44
<b>Tableau 10</b> : Résultats des absorbances des complexes standard 2/ résorcinol 1%, standard 1 /résorcinol 0.05% .....	46
<b>Tableau 11</b> : Absorbances à 410 nm de standard 1 et standard 2 en fonction de la concentration en résorcinol.....	48
<b>Tableau 12</b> : Absorbances à 485 nm de standard1 et standard2 en fonction de la concentration en résorcinol.....	49
<b>Tableau 13</b> : Résultats obtenus suite à la réaction en fonction de la concentration en standard.....	50
<b>Tableau 14</b> : Résultats d'étude de la spécificité.....	51
<b>Tableau 15</b> : Linéarité : résultats des trois séries sur standard.....	52
<b>Tableau 16</b> : Linéarité résultats des trois séries sur la forme reconstituée (échantillon) .....	53
<b>Tableau 17</b> : Résultats des calculs des paramètres de la droite de régression ...	54
<b>Tableau 18</b> : Linéarité : comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec zéro pour le standard .....	55
<b>Tableau 19</b> : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec zéro pour la forme reconstituée.....	56
<b>Tableau 20</b> : Comparaison des pentes $a_1$ et $a_2$ .....	57
<b>Tableau 21</b> : Comparaison des ordonnées à l'origine $b_1$ et $b_2$ .....	57
<b>Tableau 22</b> : Résultats des tests d'homogénéités des variances sur standard....	58
<b>Tableau 23</b> : Résultats du test de l'existence d'une pente significative sur standard. ....	60
<b>Tableau 24</b> : Résultats des tests de l'homogénéité des variances sur la forme reconstituée.....	60
<b>Tableau 25</b> : Résultats des tests d'existence d'une pente significative sur forme reconstituée	61
<b>Tableau 26</b> : Résultats du test validité de la droite de régression sur standard ...	63
<b>Tableau 27</b> : Résultats du test validité de la droite de régression sur la forme reconstituée .....	64

<b>Tableau 28</b> : Résultats du test de vérification de l'homogénéité des variances liées .....	65
<b>Tableau 29</b> : Résultats du test validité des moyennes.....	67
<b>Tableau 30</b> : Exactitude : estimation de l'intervalle de confiance de recouvrement moyen.....	68
<b>Tableau 31</b> : Résultats de Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement : Système de référence considéré : Etalon 100%, série 1 .....	68
<b>Tableau 32</b> : Résultats de Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement : Système de référence considéré : Etalon 100%, série 2 .....	69
<b>Tableau 33</b> : Résultats de Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement : Système de référence considéré : Etalon 100%, série 3 .....	69
<b>Tableau 34</b> : Etude statistique de la fidélité .....	70
<b>Tableau 35</b> : Matrice des effets d'un plan factoriel $2^3$ .....	71
<b>Tableau 36</b> : Plan d'expérience à trois facteurs et calcul d'écart type.....	72
<b>Tableau 37</b> : Calcul des limites de confiances pour les effets des paramètres ou interactions .....	73

# **SOMMAIRE**

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## **Partie théorique**

### **CHAPITRE I: Lactulose**

1. Définition.....	2
2. Propriétés physiques et chimiques.....	2
3. Propriétés pharmacologiques.....	3
3.1 Propriétés pharmacodynamiques.....	3
3.2 Propriétés pharmacocinétiques.....	4
4. Posologie et précautions d'emploi.....	5
5. Effets indésirables.....	5
6. Production classique du lactulose :.....	5
6.1 Production chimique du lactulose.....	5
6.2 Méthodes enzymatiques.....	7
7. Dégradation du lactulose.....	8
8. Caractérisation colorimétrique du lactulose.....	8

### **CHAPITRE II : Spectrophotométrie d'absorption UV-visible**

1. Principe.....	10
1.1 Rappels sur le rayonnement UV-visible.....	10
1.2 Principe de la technique.....	11
2. Absorbance et transmittance.....	11
3. Spectre UV-visible d'une molécule.....	12
4. Analyse qualitative.....	12
5. Analyse quantitative.....	12
5.1 Loi de Beer et Lambert.....	12
5.2 Validité de la loi.....	13
5.3. Choix de la longueur d'onde.....	13

### **CHAPITRE III : Validation analytique**

1. Notions sur la qualité et le contrôle qualité.....	14
1.1 Notions sur la qualité.....	14
1.2 Notions sur le contrôle qualité.....	14
2. Validation analytique.....	14
2.1 Définition de la validation.....	14

2.2 Objectif.....	15
2.3 Aspect réglementaire. ....	15
2.4 Critère de la validation analytique. ....	16
2.5 Méthodologie de la validation analytique. ....	17

## *Partie pratique*

### **CHAPITRE I : Matériels et méthodes.**

1. Matériels .....	20
1.1 Matière première et réactifs .....	20
1.2 Appareillage et équipements.....	20
1.3 Verreries.....	20
2. Méthodes.....	21
2.1 Principe. ....	21
2.2 Mise au point et optimisation de la méthode.....	21
2.2.1 Choix de la longueur d'onde .....	21
2.2.2 Optimisation de la concentration en résorcinol. ....	24
2.2.3 Optimisation de la concentration du standard et domaine de linéarité. ....	25
2.3 Validation analytique .....	27
2.3.1 Préparation des solutions .....	27
2.3.2 Spécificité .....	28
2.3.3 Linéarité et exactitude .....	29
2.3.3.1 Mode opératoire. ....	29
2.3.3.2 Etude statistique : linéarité. ....	32
2.3.3.3 Etude statistique : exactitude .....	36
2.3.4 Fidélité .....	38
2.3.4.1 Mode opératoire. ....	38
2.3.4.2 Etude statistique : fidélité .....	40
2.3.5 Robustesse .....	43
2.3.5.1 Mode opératoire .....	43
2.3.5.2 Etude statistique : robustesse.....	44

### **Chapitre II : résultats et discussion.**

1. Mise au point et optimisation de la méthode.....	46
1.1 Choix de la longueur d'onde.....	46

1.2	Optimisation de la concentration en résorcinol .....	48
1.3	Optimisation de la concentration standard .....	50
2.	Validation analytique .....	51
2.1	Spécificité .....	51
2.2	Linéarité .....	52
2.2.1	Traitement des données .....	52
2.2.2	Critères des droites de régression $D_1$ et $D_2$ .....	54
2.2.3	Comparaison des pentes et les ordonnées à l'origine avec zéro. .....	55
2.2.4	Comparaison des pentes $a_1$ et $a_2$ des droites de régression $D_1$ et $D_2$ .....	57
2.2.5	Comparaison des ordonnées à l'origine $b_1$ et $b_2$ .....	57
2.2.6	Test d'homogénéité é des variances et existence d'une pente significative.....	57
2.2.7	Test de la validité de la droite de régression. ....	62
2.3	Exactitude .....	65
2.3.1	Vérification de l'homogénéité des variances liées. ....	65
2.3.2	Test de validité des moyennes .....	67
2.3.3	Test de recouvrement moyen.....	68
2.4	Fidélité .....	68
2.4.1	Transformation des données brutes en pourcentages de recouvrement .....	68
2.4.2	Etude statistique : fidélité .....	69
2.5	Robustesse.....	71
	<b>Conclusion .....</b>	<b>74</b>

## Références bibliographiques

## Annexes

## Glossaire

## Résumé

# INTRODUCTION

L'industrie pharmaceutique est un secteur d'activité d'une grande importance tant du point de vue économique que pour l'intérêt qu'il porte pour la santé publique. Le médicament ainsi fabriqué n'est pas un produit anodin du fait qu'il est destiné à guérir des personnes déjà fragilisées par la maladie. De ce fait il est inscrit dans un circuit hautement réglementé, qualifié et surveillé.

En vue d'obtenir la qualité requise d'un médicament et de la maintenir tout au long de sa durée de validité, il est mis en place un système d'assurance qualité qui veille à l'application des bonnes pratiques de fabrication et de laboratoire. Parmi les outils requis à cette qualité, le contrôle qualité dont font partie les méthodes analytiques.

Les techniques d'analyse ont pour but de fournir des résultats de sorte que toute décision prise à la base de ce résultat soit faite en toute confiance. Pour gagner cette confiance, les autorités de régulation exigent aux industriels de valider leurs méthodes pour s'assurer de leur fiabilité.

L'un des médicaments commercialisé en Algérie pour le traitement symptomatique de la constipation est le LACTULOSE. Ce produit est commercialisé sous forme de sirop et cette forme galénique nécessite des contrôles de routine tel que la détermination de la teneur en principe actif.

Le dosage du lactulose dans un sirop est décrit dans les pharmacopées en vigueur, la méthode de référence est la chromatographie liquide à haute performance couplée au détecteur réfractométrique. Outre ses nombreux avantages de précision de sélectivité, cette méthode est d'un coût de revient non négligeable, des frais qui s'additionnent aux charges de fabrication du médicament. En effet le réfractomètre présente deux inconvénients : coût (30000 euros) et non disponibilité en Algérie (disponible chez deux voir trois industries sur 127 industries existantes). Un besoin de disposer d'une technique d'un faible coût de revient et de mise en œuvre facile s'impose et parmi les méthodes qui y en répondent, la spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet.

Le but de ce travail dans un premier temps est de mettre au point une technique de dosage de lactulose par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV et dans un deuxième lieu de valider cette technique conformément au guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques « SFSTP » publié dans la revue STP Pharma pratique en Juin 1992.

Ce travail de master II en Chimie Pharmaceutique a été réalisé au Laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, Université Mouloud MAMMERY de Tizi Ouzou.

# **PARTIE THEORIQUE**

# CHAPITRE I

Le lactulose est un diholoside synthétique largement employé dans l'industrie pharmaceutique et dans l'industrie de l'alimentation grâce à ses effets bénéfiques pour la santé humaine. Il est valorisé pour son pouvoir prébiotique et ses effets thérapeutiques. On peut retrouver ce produit dans le marché sous forme de sirop ou solution en flacon en plastique, en verre ou en sachets dosé à 66%, 66.7%, 67% et 70%.

## 1. Définition :

Le lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-fructofuranose), est un disaccharide synthétique isomère du lactose composé de deux molécules de sucre, le galactose et le fructose, qui sont liés avec une liaison de type  $\beta$ -1,4-glycosidique. Le lactulose est 1,5 fois plus sucré que le lactose il s'agit d'un des rares hydrates de carbone (à part le lactose) qui a un rôle important dans l'industrie laitière car il est contenu dans le lait. [1]

Le lactulose à deux indications : le traitement de la constipation et à doses plus élevées le traitement de l'encéphalopathie hépatique. [2]

## 2. Propriétés physiques et chimiques: [3]

- Structure :

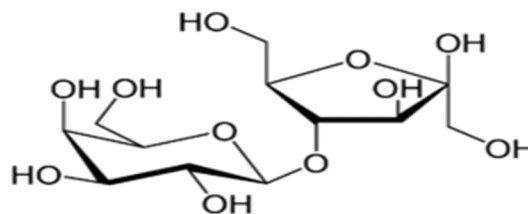


Figure1 : Structure du lactulose

**Tableau 1 : Propriétés physiques, chimiques et organoleptiques du lactulose. [3]**

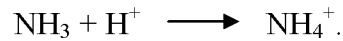
Lactulose en poudre	Propriétés physiques et chimiques et organoleptiques.
Nomenclature selon l'IUPAC	4-O-β-D-Galactopyranosyl-β-D-fructofuranose Ou (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-2-((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-4,5-dihydroxy-2,5-bis(hydroxyméthyl)tetrahydrofuran-3-yloxy)-6-(hydroxyméthyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol.
Formule générale	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Masse molaire (g/mol)	342.3
Point de fusion	169°C
Point d'ébullition	680.5°C à 760 mm hg
Point éclair	364.4°C
Solubilité	Soluble dans l'eau, assez soluble dans le méthanol et insoluble dans l'éther et le toluène
Apparence	<b>Poudre (MP) :</b> Poudre blanche <b>Sirop (PF):</b> Couleur brune transparente

### 3. Propriétés pharmacologiques :

#### 3.1 Propriétés pharmacodynamiques :

Le lactulose est un disaccharide synthétique constitué de D-galactose et de D-fructose. Dans le colon, le lactulose est métabolisé par les enzymes bactériennes en acides gras à chaînes courtes, essentiellement de l'acide lactique et de l'acide acétique, ainsi qu'en méthane et hydrogène. Cet effet entraîne une diminution de la valeur du pH et une augmentation de la pression osmotique dans le colon. Ceci stimule le péristaltisme et augmente la teneur des selles en eau.

Aux doses plus élevées, le lactulose provoque une diminution de la valeur du pH, qui entraîne une augmentation de la concentration de  $H^+$  issu du métabolisme intestinal et un remplacement du  $NH_3$  (résorbable) par du  $NH_4^+$  (non résorbable), et ce selon la réaction suivante :

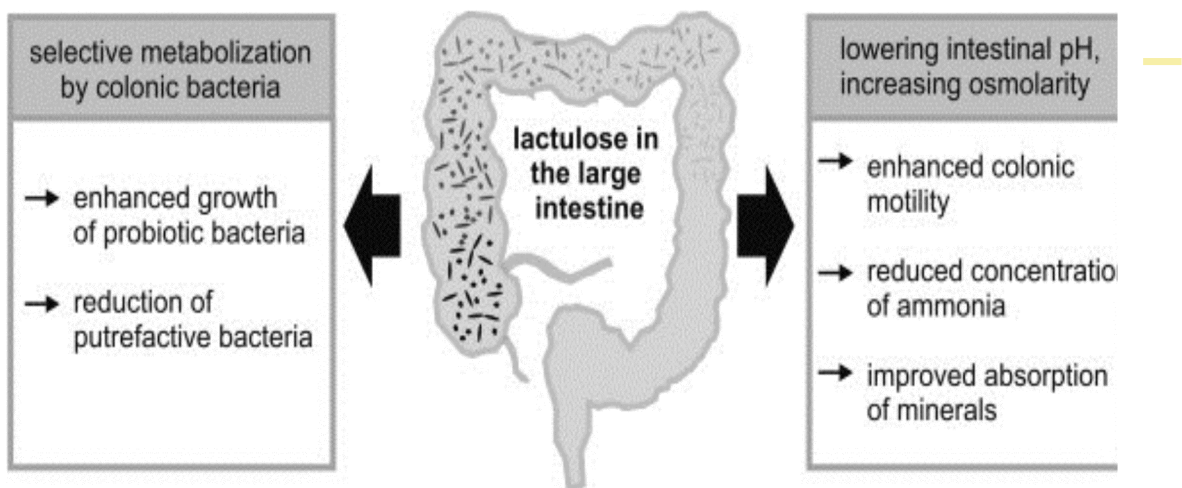


L'excrétion d'azote dans les selles est accélérée. Cet effet peut être utilisé dans le cadre du traitement d'une hyperammoniémie. Lors du traitement d'une encéphalopathie hépatique, le lactulose réduit la concentration de  $NH_3$  dans le sang d'environ 25-50 %. [2]

Un pH plus faible dans le colon entraîne la suppression des bactéries protéolytiques, qui sont impliquées dans la formation d'ammoniaque. La diminution du pH est due à l'augmentation du nombre de bactéries acidophiles (p.ex. *Lactobacillus*). La diminution du pH et l'effet osmotique nettoient le colon, ce qui stimule les bactéries à utiliser l'ammoniaque pour la synthèse des protéines bactériennes.

Le lactulose est dégradé par la flore intestinale (*Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bifidus*) en acides organiques de faible poids moléculaire, ce qui exerce un effet osmotique.

Ces acides organiques, qui sont normalement présents dans le côlon, favorisent le fonctionnement normal de l'intestin et la formation de selles molles. (fig.2)



**Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme général de l'action du lactulose sur la santé humaine. [4]**

## **3.2 Propriétés pharmacocinétiques :**

Le lactulose n'est pratiquement pas absorbé, en raison de l'absence de disaccharidase correspondante dans le tractus intestinal supérieur chez l'Homme. Non absorbé, il est intact lorsqu'il atteint le colon, où il est métabolisé par la flore bactérienne. Le métabolisme est complet aux doses allant jusqu'à 25-50 g ou 40-75 ml ; aux doses plus élevées, une partie peut être excrétée sous forme inchangée. [4]

Le lactulose est un disaccharide qui n'est pratiquement pas résorbé par la paroi intestinale et qui atteint le gros intestin sans être modifié.

## **4. Posologie et précautions d'emploi :**

La solution de lactulose peut être administrée diluée ou non diluée. La dose doit être adaptée en fonction de la réponse clinique. Le lactulose peut être administré au moyen d'une dose quotidienne unique ou en deux doses fractionnées.

Le lactulose doit être administré avec prudence aux patients intolérants au lactose. La dose normalement utilisée en cas de constipation ne devrait pas poser problème chez les diabétiques. [1]

Chez les enfants, l'utilisation de laxatifs doit être exceptionnelle et requiert une surveillance médicale.

## **5. Effets indésirables :**

Les effets indésirables du lactulose sont le plus souvent des ballonnements et des selles semi-liquides ; en utilisation prolongée des pertes d'eau et d'électrolytes, en particulier le potassium, sont possibles. [2]

## **6. Production classique du lactulose :**

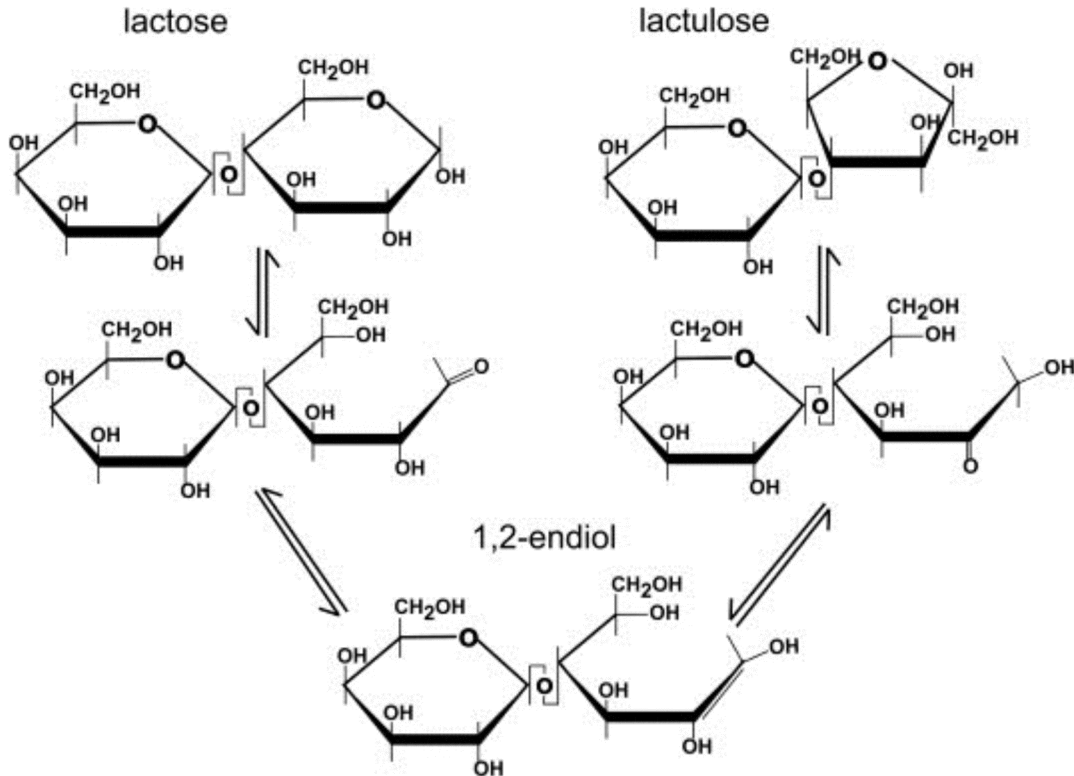
La technologie de production à échelle industrielle du lactulose est principalement basée sur la réaction d'isomérisation du lactose en milieu alcalin nécessitant des valeurs de pH supérieures à 9.

### **6.1 Production chimique du lactulose :**

Théoriquement, le lactulose peut être obtenu à partir du lactose par un regroupement du résidu de glucose vers la molécule de fructose en passant d'un aldose vers une cétose, le mécanisme de cette transformation peut être atteint de plusieurs façons. [5]

- **Réaction de Lobry de Bruyn-van Ekenstein (Fig. 3) :**

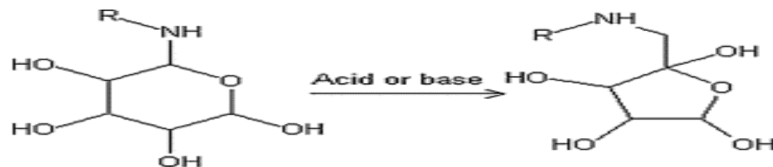
Cette réaction peut être résumée par la formation d'un intermédiaire énolique du lactose et épilactose dans un milieu alcalin, avec la transformation du glucose de la molécule de lactose en fructose, ce qui donne comme résultat la molécule de lactulose. [4]



**Figure 3 : Conversion du lactose en lactulose par le réarrangement de Lobry de Bruyn-van Ekenstein**

- **Réaction de lactose avec une amine (Fig. 4) :**

Dans ce cas, le lactosil-amine subit un réarrangement d'Amadori vers le lactulosil-amine et après hydrolyse du complexe on obtient le lactulose. [4]



**Figure 4 : Conversion du lactose en lactulose par le réarrangement d'amadori. [4]**

Actuellement, la première voie de synthèse est la technique employée industriellement pour obtenir le lactulose. Cependant, à cause du grand éventail d'applications du lactulose, de nombreux catalyseurs différents peuvent être utilisés pour essayer de trouver la façon d'obtenir un rendement plus élevé lors de la réaction d'isomérisation (voir tableau 2).

L'énergie d'activation pour la synthèse du lactulose en utilisant le lactose comme matière première diffère selon l'emploi de ces catalyseurs

**Tableau 2 : Résumé des principales caractéristiques des méthodes actuellement utilisées pour la production du lactulose [4].**

Méthode	Catalyseurs	Conditions d'isomérisation	Rendement	Purification	Problème
<b>1) Réaction alcaline</b>	Ca(OH) <sub>2</sub> , NaOH, KOH, sulfites.	70 - 100 °C pH > 10 1 - 4 h	20 - 40%	Déminéralisation Séparation lactose résiduel Décoloration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible rendement</li> <li>• Apparition des sous produits</li> <li>• Cout élevé</li> </ul>
<b>2) Réaction alcaline avec agents complexant</b>	Aluminates et borates.	70 - 100 °C pH 11 4 h	70 - 80%	Déminéralisation Élimination d'agent complexant (cristallisation, chromatographie)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxicité à cause d'agents complexant</li> <li>• Cout élevé</li> </ul>
<b>3) Réaction alcaline ionique</b>	Sépiolites, résines d'échange d'ions.		20%	Centrifugation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible rendement</li> </ul>

La méthode (01) est la plus utilisée en pharmacie, avec apparition d'impuretés dites substances apparentées (voir pharmacopée européenne ou USP). Le fructose fait partie des impuretés du lactulose (il est admis à une concentration inférieure à 1%), donc une réflexion doit être apportée à la quantité du fructose qui va interférer au résultat final du dosage.

## 6.2 Méthodes enzymatiques :

Le lactulose peut être généré enzymatiquement par le réarrangement moléculaire des structures du lactose ou par la condensation du galactose et du fructose. La synthèse enzymatique du lactulose est normalement effectuée par des enzymes  $\beta$ -galactosidase et des glycosidases.

- **Production de lactulose en utilisant des enzymes libres :**

La réaction de transgalatosylation par  $\beta$ -galactosidases pour obtenir du lactulose utilise le lactose comme donneur de galactose et le fructose comme accepteur. La production de lactulose par transgalacosylation enzymatique s'effectue à partir de  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* et de la  $\beta$ -glycosidase thermostable de *Pyrococcus furiosus*. [3]

## 7. Dégradation du lactulose :

Le lactulose peut être dégradé en galactose et en fructose par hydrolyse chimique ou enzymatique

- **Hydrolyse chimique** : basée sur une hydrolyse acide, en présence d'acide fort (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à chaud.
- **Hydrolyse enzymatique** : Basée sur l'utilisation des  $\beta$ -galactosidases.
- 

## 8. Caractérisation colorimétrique du lactulose :

Dans un milieu acide et à chaud le lactulose subit en premier lieu une hydrolyse acide, les composés obtenus ; fructose et galactose subissent une déshydratation interne, le composé ainsi obtenu est un dérivé de furfural (voir fig. 5). [6]

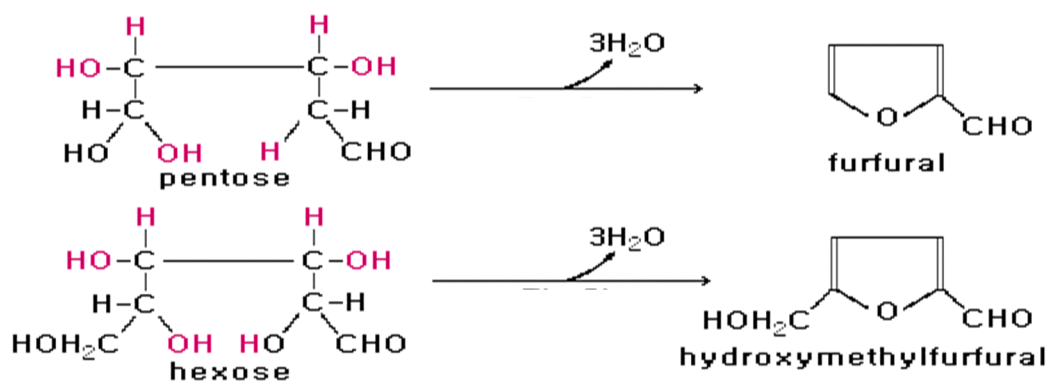


Figure 5 : Obtention d'un furfural ou dérivé dans un milieu acide et à chaud. [6]

Cette réaction ne peut se faire que si les oses issus de l'hydrolyse possèdent plus de cinq carbones (pentoses ou hexoses).

Ces dérivés furfuraliques ont la propriété de pouvoir se condenser avec des phénols (résorcinol, orcinol,  $\alpha$ -naphthol), ou des amines pour former des composés colorés dont la couleur est en fonction de l'ose de départ, permettant ainsi une analyse quantitative (dosage) ou qualitative (test d'identification). [7]

Dans le milieu acide chlorhydrique et à chaud, les cétooses (fructose dans notre cas) sont déshydratés rapidement (alors que les aldoses réagiront plus lentement), ils se condensent alors avec le résorcinol (réaction de Selivanoff) pour former un composé de couleur rouge (Voir la fig. 6)

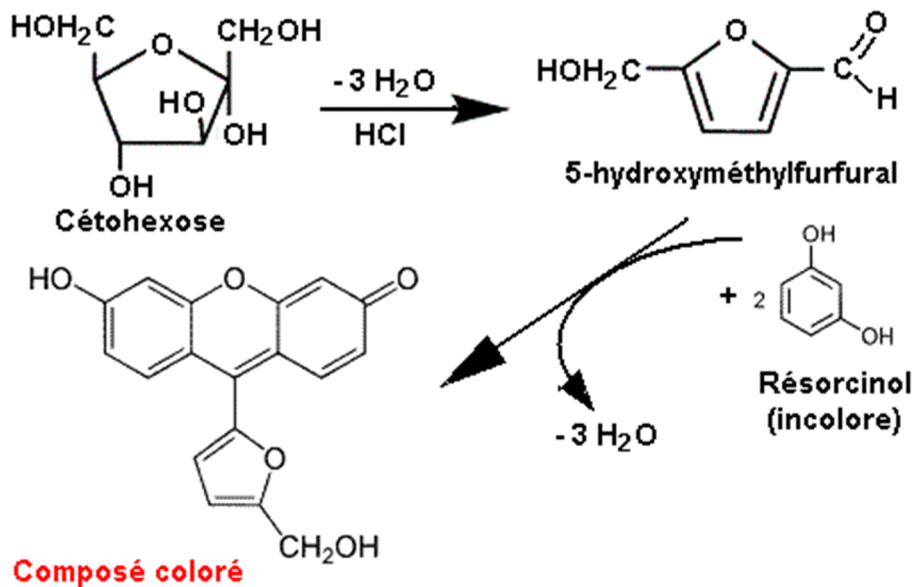


Figure 6: Réaction de Selivanoff [2]

# CHAPITRE II

La spectrophotométrie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode physique non destructive très commune dans les laboratoires d'analyses. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. D'une manière générale elle apporte peu d'informations structurales, mais elle a, en revanche, beaucoup d'applications en analyse quantitative.

### 1. Principe :

#### 1.1 Rappels sur le rayonnement UV-Visible :

Le domaine spectral UV-visible est divisé en deux plages de longueurs d'onde appelées :

- Proche UV (185 - 400 nm)
- Visible (400 - 800 nm)

La radiation dans le domaine de l'ultraviolet (UV) et du visible ne constitue qu'une petite partie du spectre électromagnétique, qui inclut d'autres formes de radiation : radio, infrarouge (IR), cosmique et rayons X. [8] (voir Fig.7).

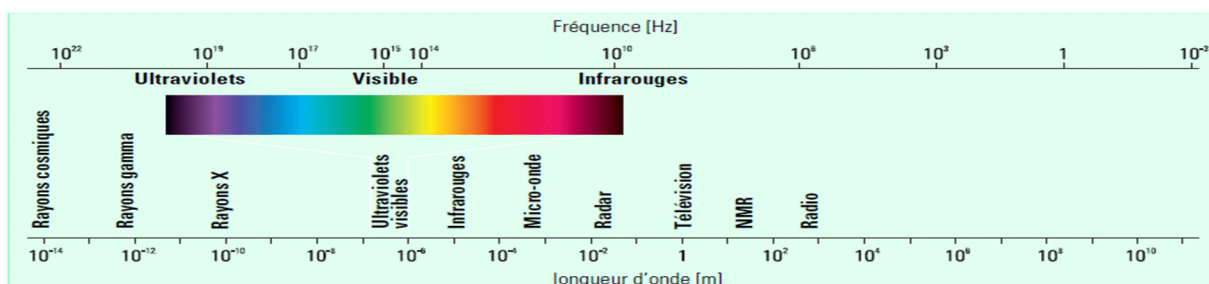


Figure 7: Spectre électromagnétique. [8]

L'équation suivante définit l'énergie associée à la radiation électromagnétique :

$$E = h \nu$$

Où  $E$  est l'énergie (en joules),  $h$  la constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-34}$  Js) et  $\nu$  la fréquence (en  $s^{-1}$ ).

$$\text{Avec } \nu = c / \lambda$$

Où  $c$  est la vitesse de la lumière ( $3 \times 10^8$   $ms^{-1}$ ) et  $\lambda$  la longueur d'onde (en mètres).

En spectrophotométrie UV-visible, la longueur d'onde est généralement exprimée en nanomètres ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). [8]

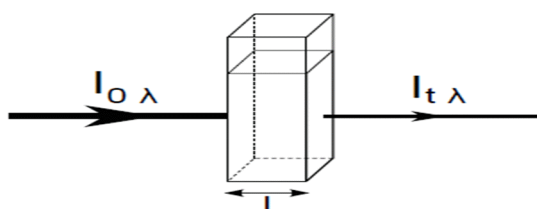
**1.2 Principe de la technique :**

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le domaine ultraviolet (UV), de 200 à 400 nm environ, et visible (VIS), de 400 à 800 nm environ, est une technique courante de contrôle et d'analyse de composés chimiques. Elle s'applique à des groupements d'atomes (ex : molécules, ions, polymères) qui absorbent le rayonnement électromagnétique dans le domaine UV-VIS appelées chromophore.

L'absorption de la lumière UV-VIS par les molécules se produit, comme pour les atomes, du fait de transitions électroniques entre différents niveaux d'énergie. Un électron à l'état fondamental absorbe des radiations d'une énergie E suffisante pour l'élever à un niveau d'énergie supérieur, l'état excité. Le retour au plus bas niveau d'énergie, l'état fondamental, se produit par perte d'énergie sous forme de chaleur.[9]

**2. Absorbance et transmittance :**

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique (de longueur d'onde  $\lambda$ ) d'intensité incidente  $I_{0\lambda}$  traverse une longueur  $l$  de solution limpide placée dans une cuve, une partie de la radiation incidente est absorbée par la solution, l'autre est transmise et son intensité est notée



$I_{t\lambda}$  avec  $I_{t\lambda} < I_{0\lambda}$  (voir fig.8). [10]

**Figure 8 : Représentation d'une cuve traversée par un faisceau incident d'intensité  $I_{0\lambda}$ .  
Un faisceau d'intensité  $I_{t\lambda}$  en émerge. [10]**

Afin de quantifier l'intensité de la radiation absorbée à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée, deux grandeurs sont introduites : la transmittance, notée  $T_\lambda$  et l'absorbance, notée  $A_\lambda$  :

$$T_\lambda = \frac{I_{t\lambda}}{I_{0\lambda}} \quad \text{et} \quad A_\lambda = \log \frac{I_{0\lambda}}{I_{t\lambda}} = \frac{1}{T_\lambda}$$

Ces grandeurs sont sans unité et la transmittance est souvent exprimée en %. [10]

### 3. Spectre UV-visible d'une molécule :

Le spectre UV-visible d'une molécule en solution se définit comme la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde ( $\lambda$ ) de la lumière incidente. Un spectre est enregistré à partir d'une solution de concentration connue dans un solvant déterminé, disposée dans une cuve d'épaisseur calibrée. Une molécule pourra être caractérisée en spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible par la description de son spectre

$A=f(\lambda)$ , en précisant les maxima et minima d'absorption, et le coefficient d'extinction moléculaire aux longueurs d'ondes correspondantes, ainsi que le solvant. [11]

### 4. Analyse qualitative :

Les modifications, au niveau moléculaire, mises en jeu dans le domaine UV-visible correspondent à des transitions électroniques des électrons de liaison, permettant ainsi la caractérisation de la molécule elle-même et non des atomes qui la constituent. Il s'agit de transition d'électrons entre orbitales moléculaires. [12]

Les groupements responsables de l'absorption UV-visible (chromophores) sont des groupements fonctionnels dans lesquels les électrons sont délocalisés (doubles liaisons conjuguées, noyaux aromatiques...). [13]

### 5. Analyse quantitative :

L'UV-Visible est largement exploité en analyse quantitative, depuis fort longtemps dans le domaine du visible. Les mesures reposent sur la loi de Beer et Lambert qui relie dans certaines conditions, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution. [14].

#### 5.1 Loi de Beer et Lambert :

L'origine de cette loi remonte aux travaux du mathématicien français Lambert qui avait, au 18<sup>e</sup> siècle, défini les bases de la photométrie. Par la suite Beer, physicien allemand du 19<sup>e</sup> siècle, a posé une loi qui permet de calculer la quantité de lumière transmise après passage à travers une épaisseur donnée d'un composé en solution dans une matrice non absorbante.

Il en est résulté la *loi de Beer et Lambert* présentée ici sous sa forme actuelle :

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

Où  $A$  désigne l'absorbance paramètre optique sans dimension, accessible au moyen du spectrophotomètre,  $l$  est l'épaisseur (en cm) de la solution traversée,  $c$  la concentration

molaire et  $\epsilon$  le coefficient d'absorption molaire ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) à la longueur d'onde  $\lambda$  à laquelle on fait la mesure. [14]

La loi de Beer et Lambert est une loi additive. Si plusieurs espèces chimiques  $i$  de concentration  $c_i$  possédant des coefficients d'absorption molaire  $\epsilon_{i\lambda}$ , absorbent à une longueur d'onde  $\lambda$ , l'absorbance totale de la solution s'écrit [10] :

$$A_{\lambda} = \sum \epsilon_{i\lambda} l c_i$$

### 5.2 Validité de la loi :

La loi de Beer et Lambert ne concerne que la fraction de la lumière absorbée, et est vérifiée dans les conditions suivantes [12] :

- une lumière monochromatique ( $\lambda$  donnée).
- une concentration faible, sinon  $A = f(c)$  n'est plus respectée (une notion d'intervalle est recommandée pour le respect de l'application de cette loi)
- absence de fluorescence et diffusion négligeables (hétérogénéité)
- la substance ne doit pas donner lieu à des réactions chimiques sous l'effet du rayonnement incident.
- la substance ne doit pas donner lieu à des associations variables avec le solvant.

### 5.3 Choix de la longueur d'onde :

Lors d'une mesure d'absorbance, il est préférable de se placer à la longueur d'onde ( $\lambda_{max}$ ) correspondant au maximum d'absorption du composé ( $A_{max}$ ). Ce choix de longueur d'onde permet :

– **d'augmenter la sensibilité** définie comme  $dA\lambda/dc$ , elle vaut  $\epsilon\lambda l$  d'après la loi de Beer-Lambert et est maximale à  $\lambda_{max}$ .

– **de minimiser l'incertitude sur A** : le monochromateur n'étant pas idéal, il laisse passer un ensemble de longueurs d'onde  $\Delta\lambda$  appelée bande passante du monochromateur. L'incertitude sur l'absorbance  $\Delta A_{\lambda}$  est minimale au maximum d'absorption. [13]

# CHAPITRE III

Le contrôle analytique d'un médicament ou de certains de ses constituants est indispensable pour garantir que le médicament en question restera sûr et efficace pendant toute sa durée de validité proposée, c'est-à-dire pendant les phases de stockage, de distribution et d'utilisation. Ce contrôle doit autant que possible être effectué selon des spécifications élaborées et validées lors de la mise au point du produit. Ainsi, on aura l'assurance que les spécifications de qualité sont applicables non seulement à la préparation pharmaceutique qui a servi à établir les caractéristiques biologiques des principes actifs, mais aussi aux formes galéniques mises sur le marché.

### 1. Notions sur la qualité et le contrôle qualité :

#### 1.1 Notions sur la qualité :

La qualité est définie par l'AFNOR (Association Française de Normalisation) comme étant, « L'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins explicites ou implicites d'un client ou des utilisateurs ».

Appliquée au domaine pharmaceutique, cette notion équivaut à l'ensemble des facteurs qui contribuent à la sécurité, l'efficacité et l'acceptabilité des médicaments. Chaque entreprise pharmaceutique se doit donc de concevoir et de mettre en œuvre une politique de qualité visant à garantir que les médicaments fabriqués présentent la qualité requise. Le patient est ainsi assuré de la qualité, à défaut d'être assuré par la qualité. [15]

#### 1.1 Notions sur le contrôle qualité :

Le contrôle qualité est un aspect de la gestion de la qualité, c'est une opération destinée à déterminer, avec des moyens appropriés, si le produit contrôlé est conforme ou non à ses spécifications ou exigences préétablies (normes).[15]

### 2. Validation analytique :

#### 2.1 Définition de la validation :

La validation d'une méthode est le procédé par lequel on confirme que la procédure analytique employée pour mener un test en particulier répond aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Les résultats de la validation de méthodes peuvent être utilisés pour juger la qualité, la fiabilité et la cohérence des résultats analytiques. Ce procédé fait partie intégrante de toute bonne pratique analytique. [16]

### 2.2 Objectif :

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée fournira 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. Dans la pratique courante, après l'étape d'optimisation, il devient de plus en plus évident et essentiel de démontrer au moyen de la validation qu'une méthode optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables. [17]

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. Celle-ci intervient après les stades de Recherche et Développement du principe actif d'un médicament et la mise au point analytique. Une fois la validation effectuée, le dossier de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) du médicament en question peut être constitué en vue de son utilisation courante. [18]

### 2.3 Aspect réglementaire :

❖ **Des guidelines ICH (International Conference on Harmonization)** ont été dédiés à la validation analytique : Q2: «Analytical Validation»

- La directive de l'ICH tripartite harmonisée sur texte (Q2A Texte concernant la validation des méthodes d'analyse) a été finalisée à l'étape 4 en Octobre 1994. Cela permet d'identifier les paramètres de validation nécessaires pour une variété de méthodes d'analyse. Il aborde également les caractéristiques qui doivent être considérés lors de la validation des méthodes analytiques qui sont inclus dans le cadre des demandes d'enregistrement.
- La directive de l'ICH tripartite harmonisée sur la méthodologie (de Q2B Validation des méthodes d'analyse: méthodologie) a été finalisée à l'étape 4 en Novembre 1996. Elle prolonge la ligne directrice Q2A d'inclure les données réelles expérimentales nécessaires, ainsi que l'interprétation statistique, pour la validation des méthodes analytiques.
- La Directive sur la méthodologie a été incorporée dans la Ligne directrice sur texte en Novembre 2005, puis rebaptisé Q2 (R1), sans aucun changement dans le contenu des deux lignes directrices. Le nouveau titre est "Validation des Procédures analytiques: Text and Methodology ».

❖ **SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques)**

Présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique. [19]

## Chapitre III : Validation analytique

En 1992 la SFSTP publie, dans STP pharma pratiques, un guide pour la validation analytique. Cette proposition a connu un succès beaucoup plus vaste puisqu'il a servi de support pour le développement du logiciel AVA (Qualilab, Orléans). [17]

### 2.4 Critère de la validation analytique :

La validation d'une méthode analytique porte généralement sur les critères suivant :

- Spécificité
- Linéarité
- Exactitude
- Fidélité :
  - Répétabilité
  - Fidélité intermédiaire
- Seuil de détection
- Seuil de quantification
- Robustesse

Toutes ces caractéristiques ne sont pas applicables à toutes les méthodes d'essai ou à tous les produits à analyser. Cela dépend en grande partie du but de l'analyse. [19]

**Tableau 3 : Résumé des critères de validation et type d'analyse. [20]**

Type de procédure <i>Label de blocage</i>	Dosage <i>Dosage</i>	Impuretés <i>Impuretés</i>		Identification <i>Identification</i>	Dosage bioanalyse <i>Dosage bioanalyse</i>
		Quantitatif <i>Quantitatif</i>	Essais limites <i>Essais limites</i>		
<i>Caractéristique</i>					
<i>Exactitude</i>	✓	✓			✓
<i>Fidélité répétabilité</i>	✓	✓			✓
<i>Fidélité</i>	✓	✓			✓
<i>Fidélité intermédiaire</i>	✓	✓			✓
<i>Spécificité</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Limite de détection</i>		✓	✓		✓
<i>Limite de quantification</i>		✓			✓
<i>Linéarité</i>	✓	✓			Fonction de réponse
<i>Intervalle de mesure</i>	✓	✓			✓
<i>Robustesse</i>	✓	✓	✓		✓

### **2.5 Méthodologie de la validation analytique :(Appliquée au dosage d'un principe actif dans une spécialité pharmaceutique)**

Cette méthodologie est basée à la fois sur les critères du code SFSTP et ICH Q2(R1). [21]

- **Protocole SFSTP**

Le but du protocole est de minimiser le nombre d'essais pour la validation et maximaliser les chances de succès et diminuer les coûts d'utilisation vérification du non interférence des excipients.

**En pratique :** Les quantités de substances à tester doivent être pesées individuellement (PA seul) et mélangées à une quantité la plus constante possible du mélange des autres composants (forme pharmaceutique reconstituée) ou produit fini.

#### **Spécificité et /ou sélectivité :**

Effectuer des essais sur le blanc et le placebo et montrer qu'ils n'interfèrent pas avec une des solutions standard dans les mêmes conditions expérimentales.

#### **Linéarité (Calibration) :**

L'intervalle de concentration ( $\pm 40\%$  de la concentration cible) à valider est couvert par 5 concentrations minimum;

Effectuer au minimum 3 séries indépendantes de ces 5 concentrations (sur le PA seul et la forme pharmaceutique reconstituée) et ce à raison d'une série de chaque par jour;

Pour les concentrations extrêmes et médianes des pesées supplémentaires sont recommandées.

#### **Exactitude :**

L'exactitude de la méthode a été évaluée en utilisant cinq niveaux de concentrations, pour chaque concentration trois mesures de la variable dépendante sont effectuées. L'opération est répétée pendant trois jours consécutifs.

#### **Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) :**

Effectuer au minimum 3 séries de 6 pesées de la concentration théorique (100%) sur la forme pharmaceutique reconstituée (ou non) et ce à raison d'1 série par jour.

#### **Robustesse :**

Préparer 02 échantillons à deux niveaux de concentrations, soit un niveau bas (95%) et un niveau haut (105%).

## Chapitre III : Validation analytique

---

Pour chaque échantillon, effectuer une analyse en provoquant une faible variation au niveau des paramètres expérimentaux (niveau haut et niveau bas), les paramètres que nous avons jugé comme étant influents sont : la teneur en PA, la concentration en résorcinol, la température de chauffage.

Réaliser pour chaque essai un standard de quantification.

# **PARTIE PRATIQUE**

# CHAPITRE I

### 1. Matériels :

#### 1.1 Matières premières et réactifs :

- Principe actif : lactulose en poudre fourni gracieusement par TSPPA.
- N° de lot : 27S106113
- Résorcinol fourni par AGD Pharm.

N° de lot : 0000202067

Date de péremption : 09/2015

- Acide hydro chlorhydrique 36.5-38% SIGMA ALDRICH

N° lot : SZBB0260V

- Eau distillée (fraichement distillée).

#### 1.2 Appareillage et équipements:

- Balance analytique de précision de type : KERN ALT 220-5 DAM  
(Précision 0.01 mg).
- Etuve de type MEMMERT
- Bain marie de type MEMMERT
- Sonicateur de type ADVANTAGE-LAB AL04-06
- Agitateur de vortex de type IKA MS3 digital
- Spectrophotomètre UV/VISIBLE de type : THERMO ELECTRO corporation,  
modèle : BIOMATE 3
- Agitateur magnétique de type : STUART (heat-stir/SB162)
- Hotte.

#### 1.3 Verreries :

- Spatule
- Bêchers
- Fioles jaugées de : 100 ml, 50ml, 25ml, 20ml, 10ml
- Pipettes jaugées de 5 ml, 2ml, 1ml
- Pipette Pasteur de 3ml
- Pro pipette
- Pissette d'eau distillée
- Papier d'aluminium
- Barreaux magnétiques
- Tubes à essais

- Portoir
- Gants et masques de sécurité

### 2. Méthodes :

#### 2.1 Principe :

L'objectif de notre travail est de mettre au point et de valider une nouvelle méthode de dosage spectrophotométrique simple pour la quantification du lactulose dans les préparations pharmaceutiques. Ce dosage se base sur la réaction de Selivanoff décrite en 1887, cette réaction est caractéristique des cétooses qui, en présence d'acide chlorhydrique concentré et à chaud, se condensent avec le résorcinol pour former un composé rouge. Ce dernier est détecté par spectrophotométrie UV visible. [22]

Le procédé est basé sur l'hydrolyse du lactulose dans des conditions acides. Le produit de l'hydrolyse réagit avec la résorcine, ce qui donne des pics d'absorption dans l'UV visible, le protocole expérimental suivi a été inspiré des recommandations de la commission SFSTP publié dans la revue STP- pharma pratique – 1992.

La démarche empruntée est divisée en deux parties :

- Mise au point et optimisation des conditions d'analyse.
- Validation analytique de la méthode (étude de la linéarité, de l'exactitude, de la fidélité et de la spécificité).

#### 2.2 Mise au point et optimisation de la méthode :

##### 2.2.1 Choix de la longueur d'onde :

##### Mode opératoire :

Préparation des solutions standards à deux niveaux de concentration (1 mg/ml et 0.05 mg/ml), afin de faire une comparaison entre celle que nous avons proposée (1 mg/ml) et celle de l'année passée (0.05 mg/ml) [23] dans le but d'évaluer leur impact sur la significativité des absorbances correspondantes :

- Peser respectivement 100 mg et 5 mg de lactulose dans des fioles de 100 ml, remplir avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- Effectuer une dilution d'un dixième :

Prélever 5ml de la solution mère avec une pipette jaugée de 5ml.

Mettre dans une fiole de 50 ml et ajuster jusqu'au trait de jauge.

- Préparation de solution de résorcinol à 1% et 0.05% : Peser respectivement 1 g et 0.05 g de résorcinol dans des fioles de 100 ml, compléter ensuite avec l'HCl concentré jusqu'au trait de jauge.

- Préparation des mélanges :

Prélever 5 ml des solutions standards filles soit 0.1 mg/ml et 0.005 mg/ml, avec une pipette jaugée de 5 ml, mettre dans un tube à essai et ajouter 4 ml de résorcinol 1% et 0.05% respectivement.

- Chauffage pendant 20 minutes à 70°C.
- Refroidissement à l'air ambiant.
- Préparation des blancs (5ml d'eau distillée +4ml de la solution résorcinol dosé à 1% et à 0.05%)
- Effectuer un scan entre 392 et 492nm.

Le schéma ci-dessous récapitule l'ensemble des opérations effectuées dans cette étape :

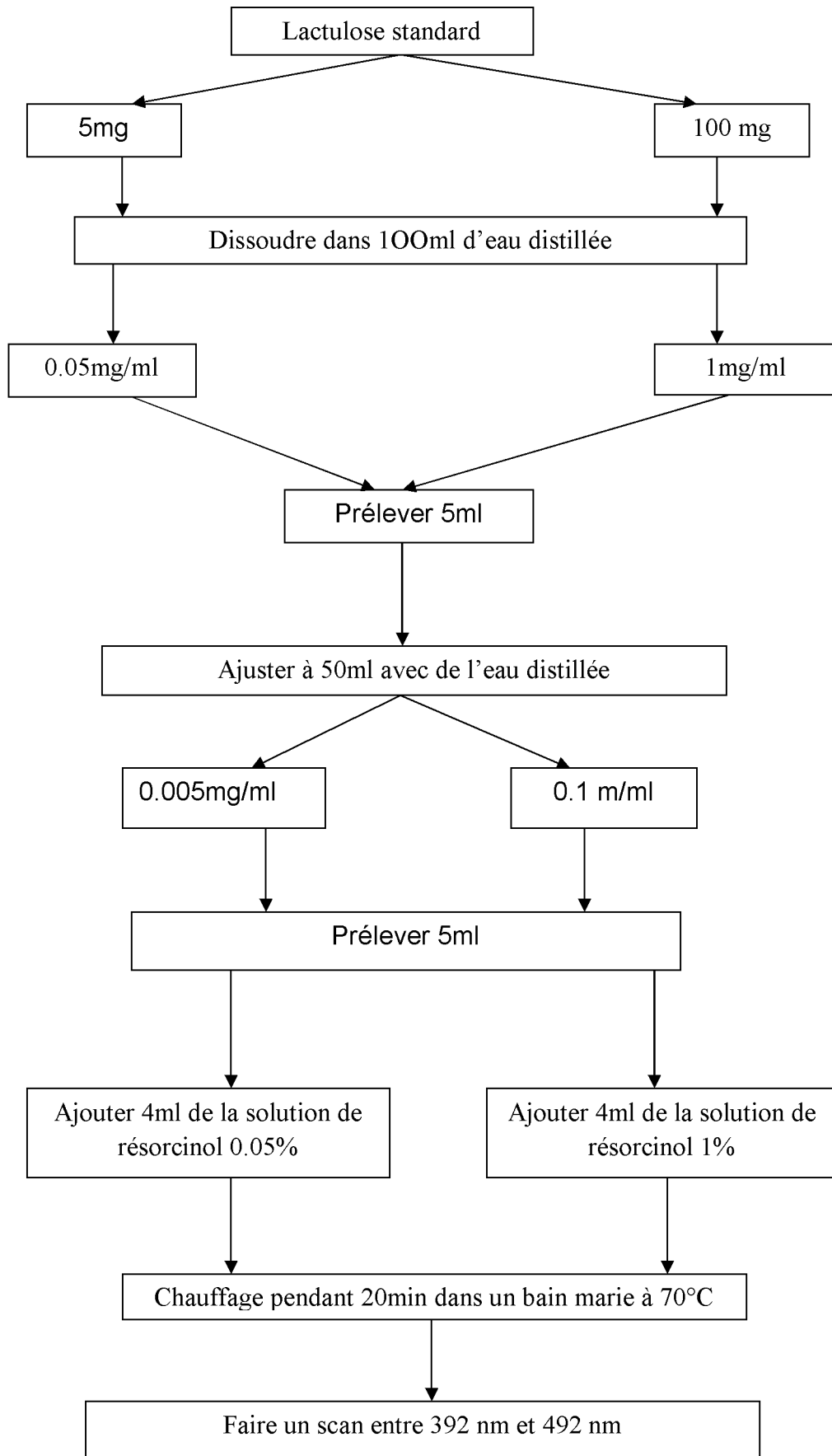


Figure 9 : Protocole expérimental permettant l'optimisation de la longueur d'onde.

2.2.2 Optimisation de la concentration en résorcinol :

Mode opératoire :

- Deux solutions standard 1 et standard 2 de concentration 0.005mg/ml et 0.1mg/ml respectivement ont été préparées.
- Effectuer des dilutions afin obtenir des concentrations autour de 0.01% ; 0.025% ; 0.05% ; 0.1% ; 0.25% ; 0.5% ; 0.75% à partir d'une solution de résorcinol à 1%

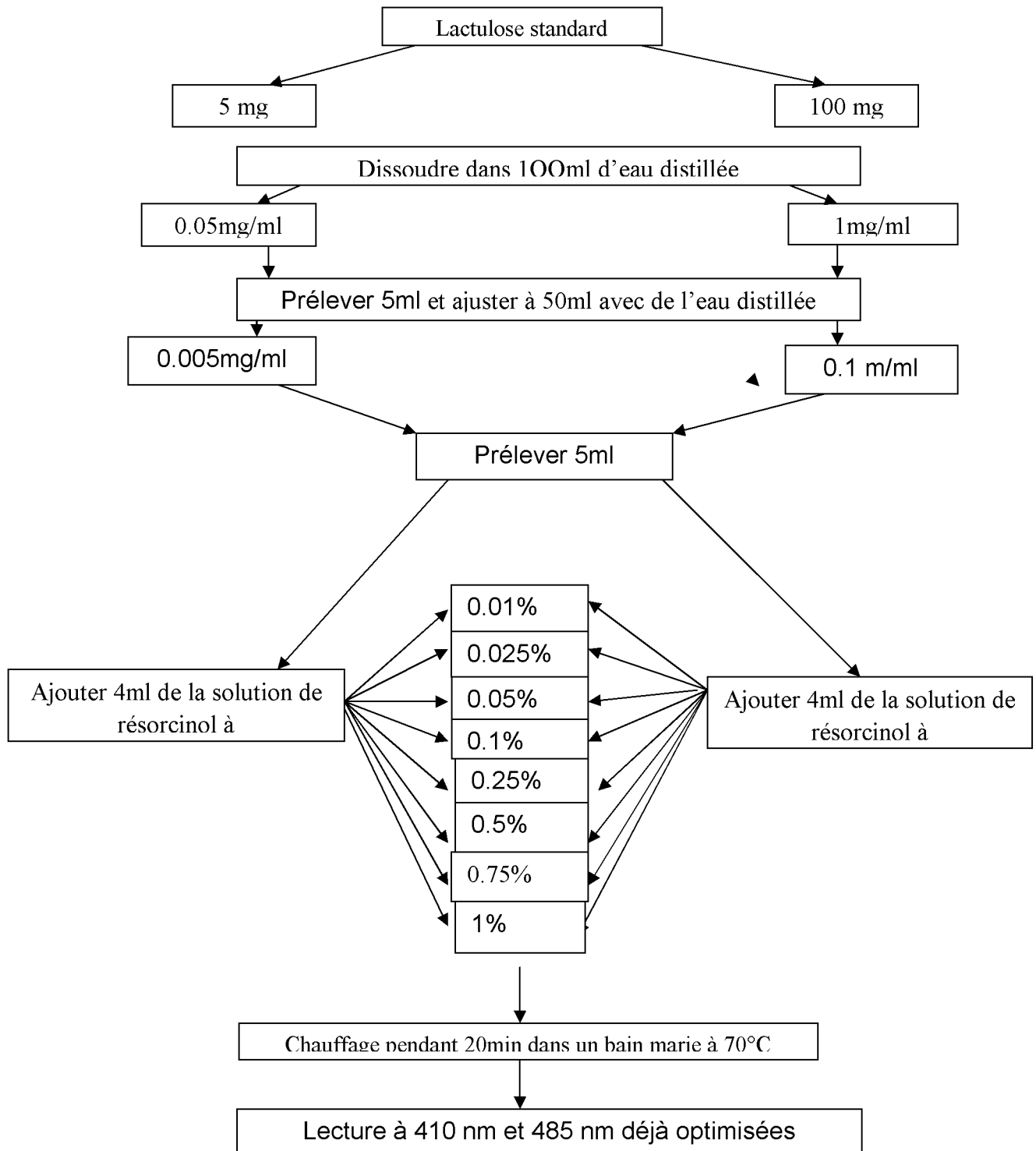


Figure 10 : Protocole expérimental permettant d'optimiser la concentration en résorcinol

### 2.2.3 Optimisation de la concentration du standard en fonction de la réponse de la méthode :

#### Protocole :

- Préparation d'une solution standard dont la concentration est de 1 mg/ml ;
- Effectuer des dilutions de l'ordre de 1/2 ; 1/3 ; 1/4 ; 1/5 ; 1/10 ; 1/20 ; 1/100
- Préparation de la solution résorcinol à 0.25% précédemment optimisée
- Réalisation des mélanges :

5ml de la solution standard de concentration X + 5ml de la solution résorcinol 0.25% déjà optimisé.

**N.B :** Le volume de la solution de résorcinol a changé dans le but de fournir plus de précision et diminuer le risque de variabilité des résultats, tout en sachant qu'en travaillant en excès de réactifs n'influence pas la réaction.

- Chauffage pendant 20 minutes
- Préparation du blanc (5ml d'eau distillée +5ml de la solution résorcinol 0.25%)
- Lecture par spectrophotométrie UV visible à  $\lambda=410\text{nm}$  et  $\lambda=485\text{nm}$

Le schéma suivant résume le protocole cité :

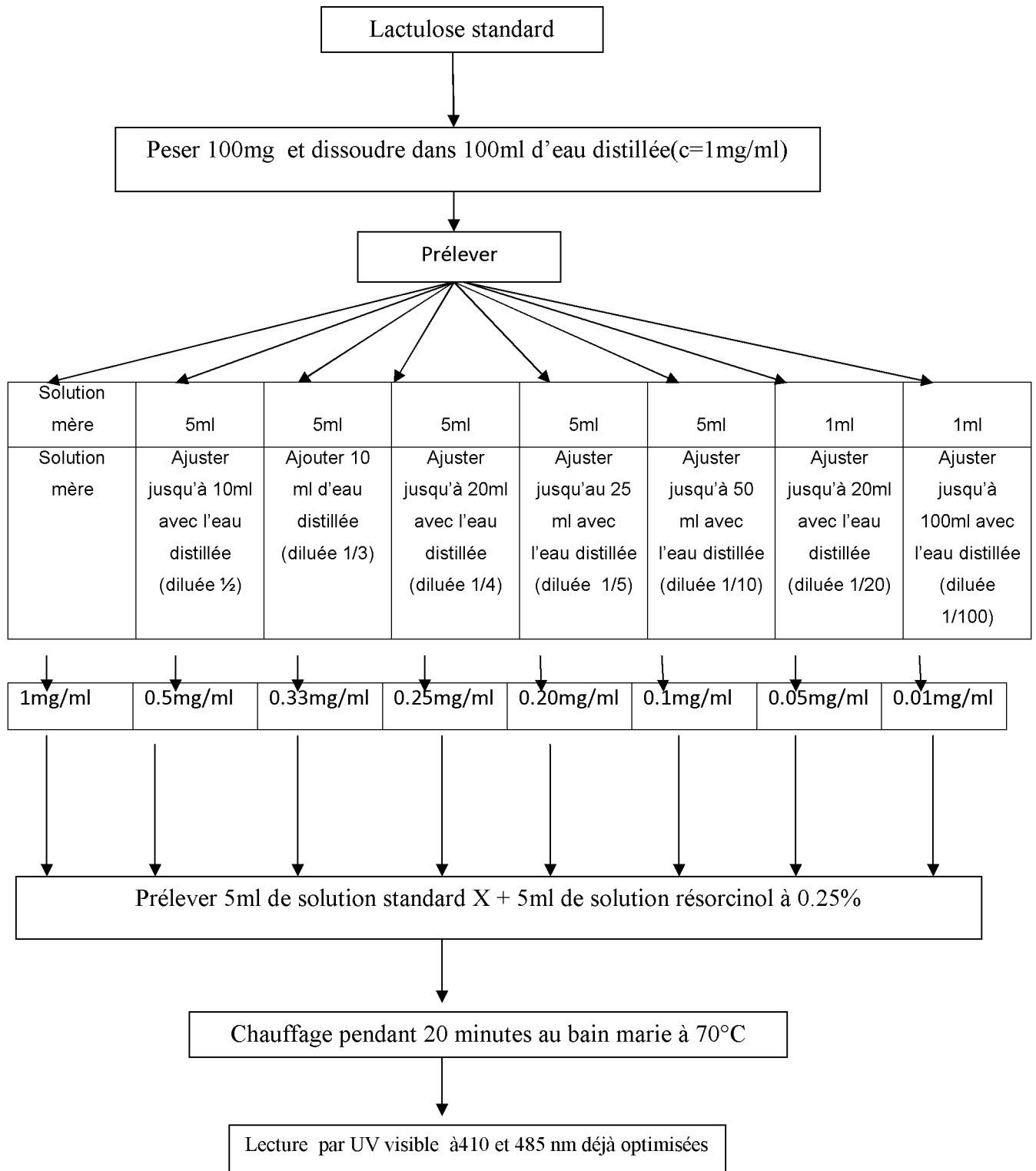


Figure 11 : Protocol expérimental de l'optimisation de la concentration standard.

### 2.3 Validation analytique :

Selon les recommandations ICH et SFSTP les critères à étudier pour une méthode de dosage sont :

- La Linéarité ;
- L'Exactitude ;
- La Fidélité ;
- La Spécificité.
- Robustesse.

N.B : Comme nous nous sommes basés sur le protocole de la commission SFSTP publié en 1992, il n'était nécessaire de l'étudier car à cette époque la stabilité n'était pas encore exigée, contrairement aux nouvelles versions de l'USP, OMS ou ICH où il faut impérativement étudier la stabilité des solutions.

**2.3.1 Préparation des solutions :** Après avoir optimisé les conditions d'analyse.

❖ **Solution résorcinol :**

Peser 0.25g de résorcinol et dissoudre dans 100 ml de HCl concentré, la solution est instable dans les conditions suivantes:

Elle change de couleur et devient rose à la lumière et l'air, d'où l'intérêt de la préparer juste avant l'utilisation, et la mettre à l'abri de l'air et la lumière durant la période de son utilisation.

Le tableau suivant montre le changement de la valeur de l'absorbance en utilisant une solution de lactulose (0.5mg/ml) et la même solution de résorcinol 0.25% conservée pendant deux jours successifs.

**Tableau 4 : Effet de la dégradation de la solution résorcinol sur le résultat final.**

	protocole	Valeur de l'absorbance à 485nm
1 <sup>er</sup> jour	5ml de la solution lactulose (0.5mg/ml) +5ml de la solution résorcinol 0.25%, nouvellement préparée, puis chauffage pendant 20 min	A=0.411
2 <sup>eme</sup> jour	5ml d'une solution lactulose (0.5mg/ml) +5ml de la solution résorcinol 0.25% préparée le jour précédent, puis chauffage pendant 20min	A= 0.583

A partir des résultats du tableau, nous avons constaté que la conservation de la solution du résorcinol pour sa réutilisation ultérieure influence le résultat final, et ce en raison de l'instabilité de cette dernière dans le temps d'où l'intérêt de la préparer juste avant l'usage.

### ❖ Solution échantillon (forme reconstituée)

Sur l'emballage du produit commercialisé, il est indiqué que chaque 15ml de la solution contient 10g de lactulose ajouté sous forme de lactulose en poudre.

Cela implique que chaque 1ml contient 0.667g (667mg)

On cherche la quantité de lactulose contenue dans 50ml ;

1ml (solution)  $\longrightarrow$  0.667g (lactulose)  
50 ml (solution)  $\longrightarrow$  x g (lactulose) }  $\times$  théorique=33.35 g de lactulose

### ❖ -Déterminer la densité de la solution reconstituée

$$d = \frac{g_{\text{sol. lac}}}{g_{\text{eau}}}$$

#### Protocole:

Peser une fiole de 50 ml vide ( $m = 36.72931\text{g}$ )

Peser la même fiole pleine d'eau ( $m = 86.6573\text{g} \iff m_{\text{eau}} = 49.92799\text{g}$  à  $20^\circ\text{C}$ )

Sécher la même fiole et peser dedans la poudre de lactulose ( $m_{\text{expérimentale}} = 33.90491\text{g}$ )

Solubiliser et ajuster avec l'eau distillée jusqu'à 50 ml

Chauffer tout en maintenant une agitation magnétique

Une fois que la solution est prête, repeser ( $m_{\text{ech}} = 62.0313\text{g}$ ) à  $20^\circ\text{C}$ .

$$d = \frac{m_{\text{ech}}}{m_{\text{eau}}}$$

Application numérique :  $d = (62.0313 / 49.92799)$

$$d = 1.242$$

### 2.3.2 Spécificité :

L'étude de la spécificité consiste à démontrer une absence d'interférences des excipients avec le principe actif.

#### Protocole :

Afin de d'évaluer la spécificité de la méthode, on analyse les solutions suivantes :

- Une solution blanc contenant l'eau et la solution résorcinol 0.25%)

- Une solution de la forme pharmaceutique reconstituée sans la substance à doser (Placebo=eau + HCl) ;

- Une solution de la forme pharmaceutique reconstituée; dosée à 0.5 mg/ml.

- Une solution standard contenant le principe actif, dosée à 0.5 mg/ml.

### 2.3.3 Linéarité et exactitude :

#### 2.3.3.1 Mode opératoire :

L'étude est réalisée sur le standard et la forme reconstituée suivant le même protocole. L'intervalle de concentration à valider est couvert par une série de 5 concentrations ( $k=5$ ), régulièrement espacées et positionnées, autour de 60, 80, 100, 120, 140% de la concentration théorique (50mg/ml).

Pour chaque concentration, trois séries indépendantes sont réalisées ( $n=3$ ), analysées sur trois jours successifs, à raison d'une série par jour.

Pour chaque solution 3 lectures successives sont effectuées et c'est la moyenne qui est prise en considération.

❖ **Standard** :  $k=5$ ,  $n=3$  (voir fig.12)

Peser les masses de 30, 40, 50, 60 et 70 mg en lactulose correspondant à 60, 80, 100, 120 et 140% de la concentration cible.

❖ **Echantillon** :  $k=5$ ,  $n=3$  (voir fig.13)

**Tableau 5 : Teneur de la solution échantillon en PA**

Gamme	Masses théoriques standard (mg)	Masses théoriques équivalentes en solution échantillon (mg)
60%	30	54.8870
80%	40	73.1826
100%	50	91.4783
120%	60	109.774
140%	70	128.069

Afin d'assurer une meilleure précision ; les masses de l'échantillon ont été multipliées par dix, ainsi nous avons eu les masses suivantes :

548.870mg, 731.826mg, 914.783mg, 1097.74mg, 1280.69mg en forme reconstituée.

-Peser dans des fioles de 100ml.

-Ajuster jusqu'au trait de jauge avec l'eau distillée.

-Les solutions échantillons doivent subir des dilutions de 1/10.

-Lancer la gamme standard et la gamme échantillon le même jour, la même opération est répétée le 2ème et le 3ème jour.

Les schémas récapitulatifs suivant résument les principales étapes effectuées pour préparer la gamme de linéarité sur standard et formes reconstituée ;

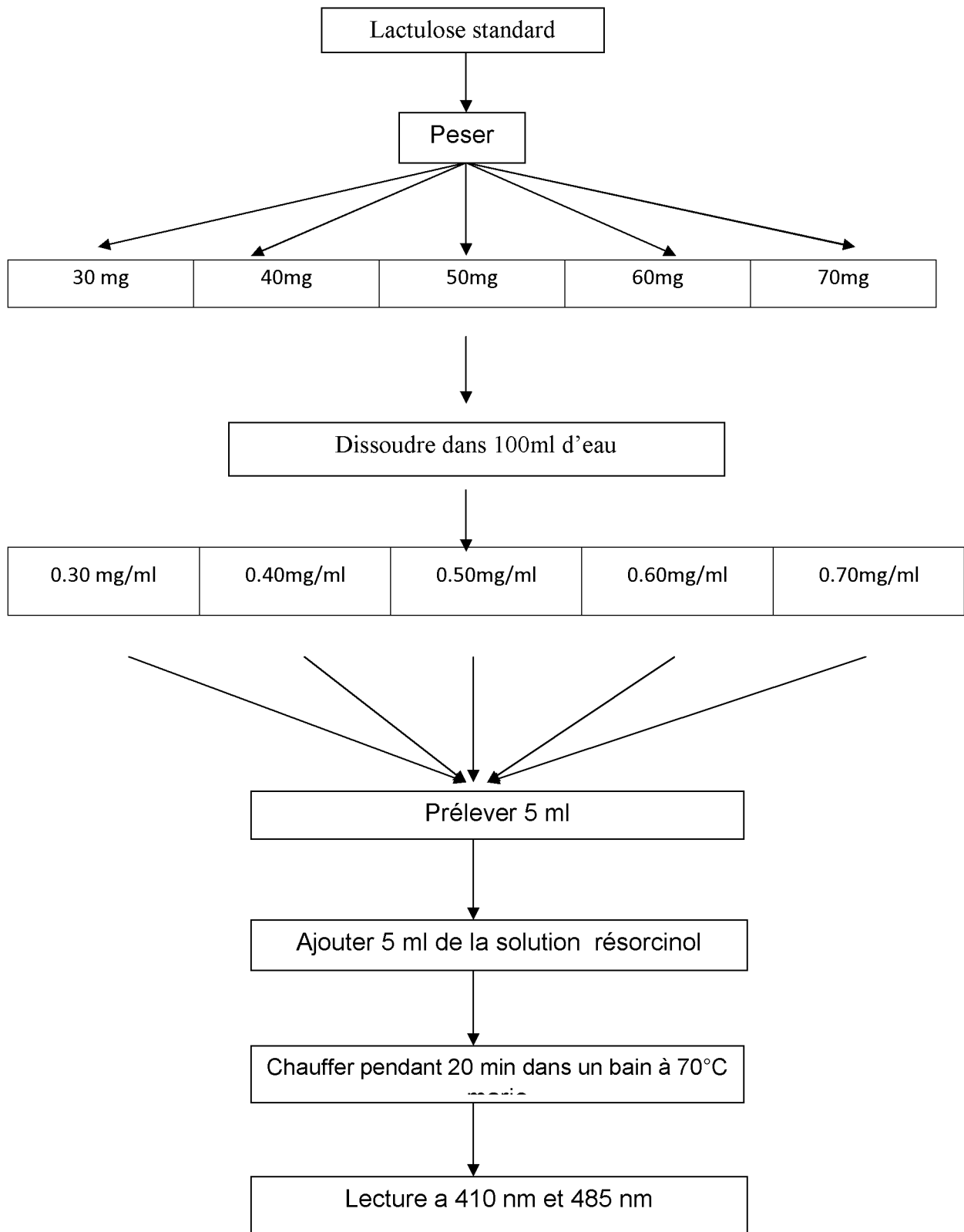


Figure 12 : Protocole expérimental pour le dosage de lactulose standard (linéarité).

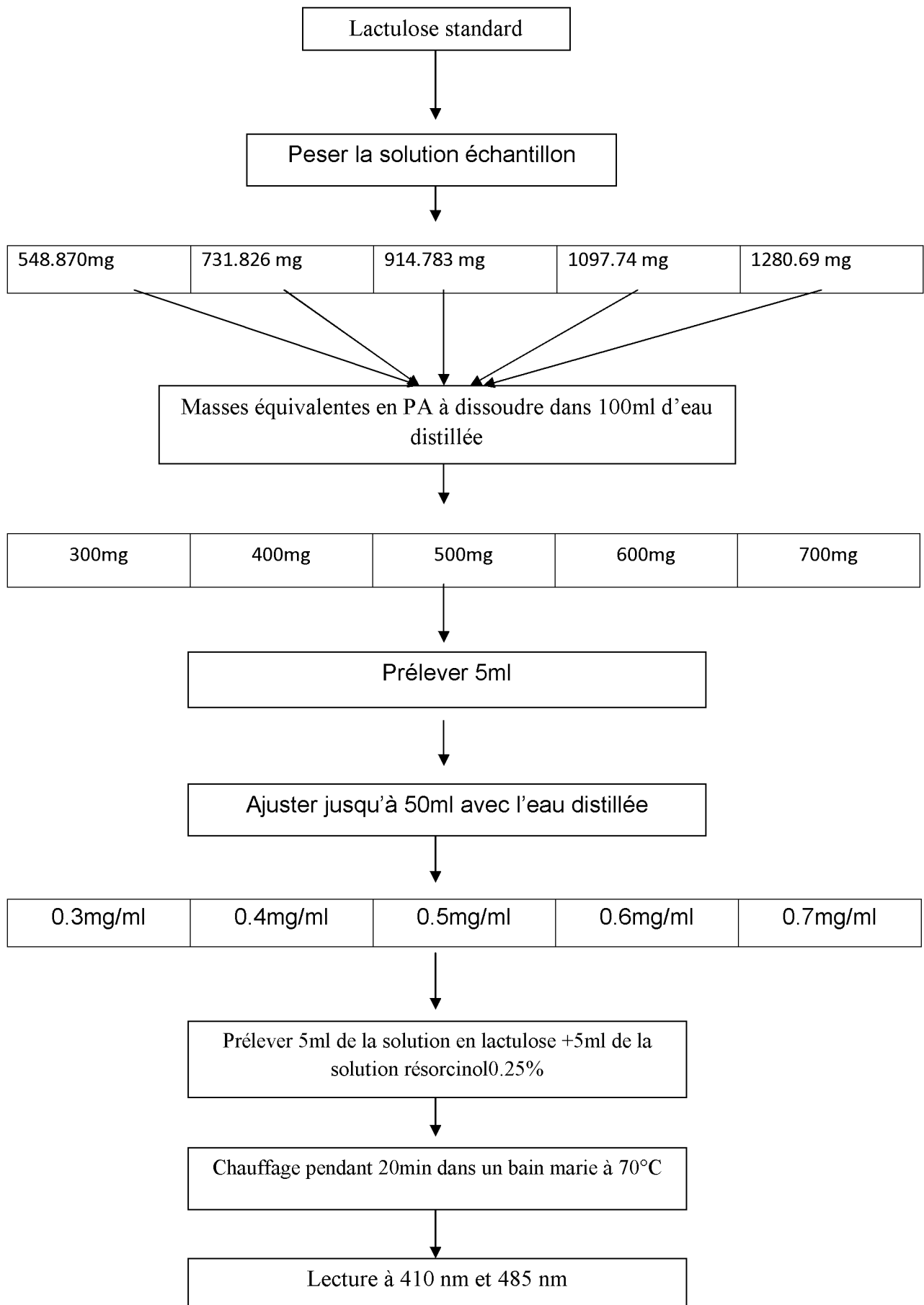
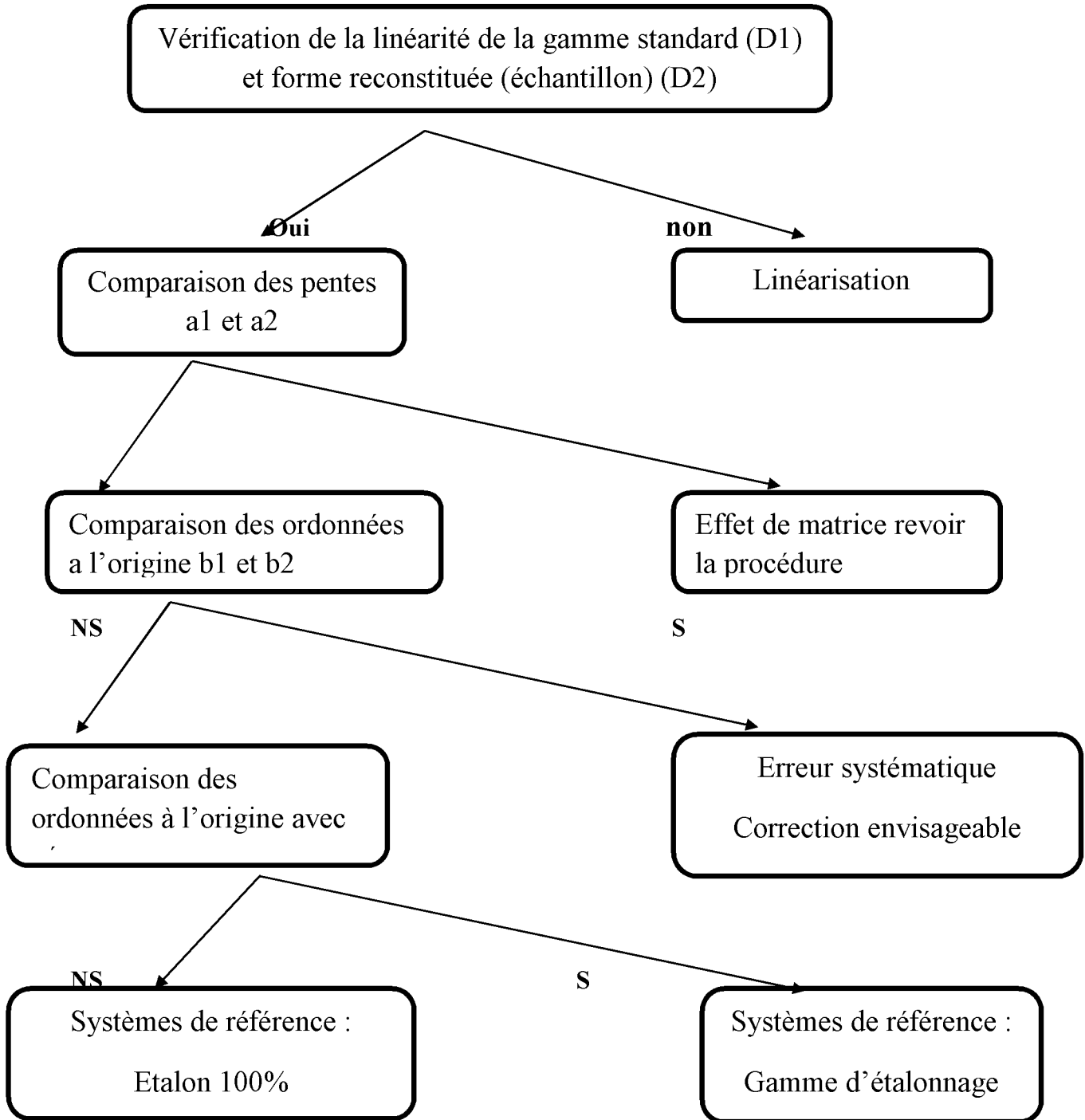


Figure 13 : Protocole expérimental de dosage de lactulose dans la forme reconstituée (linéarité).

**2.3.3.2 Etude statistique : linéarité.**

La démarche de l'analyse statistique est de démontrer que la méthode est linéaire dans l'intervalle de concentration choisi pour le composant seul, et pour la forme pharmaceutique reconstituée (échantillon), puis de démontrer que les deux droites ne sont pas statistiquement différentes. [24]

La démarche statistique à suivre est résumée ci-dessous :



S : Significatif

NS : Non significati

**Figure14 : Démarche statistique de l'étude de la linéarité. (23)**

❖ **Estimation d'une droite de régression linéaire :**

Elle est déterminée à partir des couples  $(x_{ij}, y_{ij})$ .

Soit  $y = A.x + B$  l'équation de la droite de régression réelle inconnue.

**A** est la pente, **B** est l'ordonnée à l'origine. Les estimations recherchées **a** et **b** de **A** et **B** correspondent à une droite d'équation  $y = a.x + b$ , qui est l'estimation de la droite réelle inconnue. [23]

❖ **Calcul de la pente (a) :**

L'estimation de la pente **a** s'obtient en appliquant la méthode des moindres carrés : Le but est de rendre minimal la somme des carrés des écarts  $(Y_{ij} - Y'_{ij})$  entre les valeurs expérimentales  $Y_{ij}$  et les valeurs estimées  $Y'_{ij}$ .

$$a = \frac{\sum_{j=0}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}) \cdot (y_{ij} - \bar{y})}{\sum_{j=0}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2}$$

$x_{ij}$ : Valeur brute indépendante

$y_{ij}$ : Valeur brute dépendante

$\bar{x}$ : Moyenne des valeurs  $x_{ij}$  des k groupes

$\bar{y}$ : Moyenne des observations  $y_{ij}$  des k groupes.

Soient **a<sub>1</sub>** et **a<sub>2</sub>** les pentes des droites **D<sub>1</sub>** (droite sur principe actif seul) et **D<sub>2</sub>** (droite sur forme pharmaceutique reconstituée).

❖ **Calcul de l'ordonnée à l'origine(b) :**

Selon la méthode des moindres carrés, la droite de régression linéaire passe par le point de coordonnées  $\bar{x}$  et  $\bar{y}$  donc l'équation suivante est vérifiée :

$$b = \bar{y} - a\bar{x}$$

Soient **b<sub>1</sub>** et **b<sub>2</sub>** les ordonnées à l'origine des droites **D<sub>1</sub>** et **D<sub>2</sub>**.

❖ **Calcul du coefficient de corrélation (r) :**

Bien que les informations fournies par le coefficient de corrélation soient limitées, sa détermination est aisée, soient :

$s_{x_{ij}}$  et  $s_{y_{ij}}$  et les écarts types respectifs des variables et  $S_{x_{ij}y_{ij}}$  la covariance des variables  $y_{ij}$  et  $x_{ij}$ .

Calcul de la covariance :

$$S_{x_{ij}y_{ij}} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}) \cdot (y_{ij} - \bar{y}) / (N - 1)$$

Calcul du coefficient de corrélation :

$$r = \frac{S_{x_{ij}y_{ij}}}{(S_{x_{ij}} \cdot S_{y_{ij}})}$$

Soient  $r_1$  et  $r_2$  les coefficients de corrélation respectifs des droites  $D_1$  et  $D_2$ .

❖ **Tests de comparaison des ordonnées à l'origine avec zéro :**

La comparaison avec zéro s'effectue par le calcul suivant :

$$\frac{|b|}{S_b} < t_{(\alpha; N-2)}$$

$t_{(\alpha; N-2)}$  : Lu dans la table de Student.

$S_{b1}$  : Ecart type de l'ordonnée à l'origine de la droite  $D_1$

$S_{b2}$  : Ecart type de l'ordonnée à l'origine de la droite  $D_2$

Si l'inégalité est vérifiée on peut affirmer que les ordonnées à l'origine des droites respectivement  $D_1$  et  $D_2$  ne sont pas significativement différentes de zéro au seuil de probabilité  $p = 1 - \alpha$ .

❖ **Comparaison des pentes des droites  $D_1$  et  $D_2$  :**

Soient  $S_{a1}^2$  et  $S_{a2}^2$  les variances respectives des pentes  $a_1$  et  $a_2$  des droites  $D_1$  et  $D_2$ . La comparaison des pentes  $a_1$  et  $a_2$  s'effectue avec un test de  $t$ , donné par la relation suivante :

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

Si  $t < t_{(\alpha; N_1+N_2-4)}$  lu dans la table de Student, on peut affirmer que les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque  $\alpha$ .

❖ **Comparaison des ordonnées à l'origine des droites D1 et D2 :**

La comparaison des ordonnées à l'origine  $b_1$  et  $b_2$  s'effectue avec un test de  $t$ , donné par la relation suivante

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

Si  $t < t_{(\alpha; N_1+N_2-4)}$  lu dans la table de Student, on peut conclure que les ordonnées à l'origine des droites D1 et D2 ne sont pas significativement différentes au risque  $\alpha$ .

❖ **Test d'homogénéité des variances :**

Le test de Cochran a été appliqué aux variances des  $y_i N_{ij}$  pour vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale.

Le critère à utiliser est :

$$c = S_{max}^2 / \sum_{j=1}^k S_j^2$$

$S_{MAX}^2$ : La variance la plus élevée des k groupe j

$S_j^2$ : La variance du groupe j

Si l'inégalité suivante est vérifiée :  $C < C_{(\alpha; k; n-1)}$  l'ensemble des variances des différents

groupes j peut être considéré comme homogène au risque  $\alpha$ .

❖ **Test de l'existence d'une pente significative :**

$$F_1 = \frac{S_L^2}{S_R^2} > F_{(\alpha; 1; N-2)}$$

Ce test consiste à comparer les variations dues à la régression et aux erreurs (expérimentales et d'ajustement) :

Si  $F_1$  est significatif, on conclut à l'existence d'une pente, donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré.

Tableau 6: Test de l'existence d'une pente significative. (23)

Variations	DDL	Sommes des carrés	variances	Fcalculé
Variations totale	N-1	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$		$F_1 = \frac{S_L^2}{S_R^2}$
Variation due à la régression	1	$\sum l^2 = a^2 \sum_{j=1}^k n_j (\bar{X}_j - \bar{X})^2$	$S_L^2 = \sum l^2$	
Variation résiduelle	N-2	$\sum R^2 = \sum T^2 - \sum l^2$	$S_R^2 = \frac{\sum R^2}{(N-2)}$	

❖ Test de validité de la droite de régression :

Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement ( $S_L^2$ ) et expérimentales ( $S_E^2$ )

$$F_2 = \frac{S_L^2}{S_E^2} (F_{\alpha; k-2; n-k})$$

Si  $F_2$  n'est pas significatif, l'ajustement est considéré comme valide au seuil de probabilité considéré.

Tableau 7 : Test de validité de la droite de régression

Variations	DDL	Somme des carrés	Variance	Fcalculé
Erreur expérimentale	N-k	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$S_E^2 = \frac{\sum E^2}{N-k}$	$F_2 = \frac{S_L^2}{S_E^2}$
Erreur de la régression	k-2	$\sum L^2 = \sum R^2 - \sum E^2$	$S_L^2 = \frac{\sum L^2}{k-2}$	

2.3.3.3. Etude statistique : Exactitude

Le signal de la forme pharmaceutique reconstituée et le principe actif seul montre une linéarité satisfaisante et que les droites  $D_1$  et  $D_2$  sont superposables alors l'étude statistique de l'exactitude est réalisable.

Les données à exploiter pour l'étude de l'exactitude sont celles obtenues pour l'étude de la linéarité. Considérer le recouvrement entre les pesées retrouvées grâce au système de référence considéré et les pesées introduites :

❖ **Système de référence considéré : Droite D<sub>1</sub> :**

Ce système de référence est utilisé lorsque les ordonnées à l'origine des droites D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> sont significativement différents de zéro

Effectuer le changement de variable suivant :

$$Y_{ij} = \frac{(Y_{ij}-b_2)}{(a_2 \cdot X_{ij})}$$

Nous disposons ainsi de N valeurs Y<sub>ij</sub> réparties en k groupes de n valeurs.

❖ **Système de référence considérée : Etalon 100% :**

Soient x<sub>100</sub> et y<sub>100</sub> respectivement la pesée et l'observation correspondant à la solution de référence. Effectuer le changement de variable suivant :

$$Y_{ij} = \frac{y_{ij} \cdot x_{100}}{x_{ij} \cdot y_{100}}$$

Cette méthode permet d'évaluer l'exactitude dans les conditions de dosage routinières.

Les tests suivants s'effectuent quel que soit le système de référence considéré.

❖ **Vérification de l'homogénéité des variances liées :**

Effectuer le test de Cochran en considérant les valeurs Y<sub>ij</sub> (recouvrement) pour vérifier l'homogénéité des variances des différents groupes j. Le critère à utiliser est :

$$C = \frac{S_{max}^2}{\sum_{j=1}^k S_j^2}$$

S<sub>j</sub><sup>2</sup>: Variance du groupe j

S<sub>max</sub><sup>2</sup>: Variance la plus élevée des k groupes j

Si l'inégalité suivante est vérifiée : C < C<sub>(α ; k ; n-1)</sub> l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque α .

❖ **Test de validité des moyennes :**

Ce test consiste à comparer les erreurs inter-groupes et intra-groupes :

$$F_3 = \frac{S_C^2}{S_E^2} < F_{(\alpha ; k-1 ; N-1)}$$

Si F<sub>3</sub> n'est pas significatif, on peut dire, au risque considéré, que les variations des observations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentales. [23]

**Tableau 8** : Test de validité des moyennes

Variation	DDL	Somme des carrés	Variances	F calculé
Variation totale	N-1	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$	$S^2_T = \sum T^2 / (N-1)$	$F_3 = S^2_C / S^2_E$
Variation intra-groupe	N-k	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$S^2_E = \sum E^2 / (N-K)$	
Variation inter-groupe	k-1	$\sum C^2 = \sum T^2 - \sum E^2$	$S^2_c = \sum C^2 / (K-1)$	

❖ **Estimation du recouvrement moyen :**

Après avoir vérifié le test précédent, il est possible de calculer la valeur du recouvrement moyen et son intervalle de confiance :

$$\bar{Y} = \sum_{j=1}^k \left( \frac{1}{kn_j} \right) \sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij}$$

$$I_{Rm} = \bar{Y} \pm \frac{t_{(\alpha; N-1)} \cdot S_t}{\sqrt{N}}$$

$t_{(\alpha; N-1)}$  : Lu dans la table de Student.

**2.3.4 Fidélité :**

**2.3.4.1 Mode opératoire :**

- ❖ Préparer une solution standard dont la concentration est de 0.5 mg/ml (100%)/  
Peser 50 mg de lactulose standard et dissoudre dans 100ml d'eau distillée
- ❖ Préparer six solutions échantillon 100%  
Peser 914.783mg de la solution en lactulose (forme reconstituée) qui contient 500mg en lactulose.
- Prélever 5ml de la solution et ajuster jusqu'à 50ml soit une dilution de 1/10
  - ❖ Préparer une solution de résorcinol 0.25%
  - ❖ Réaliser des mélanges dans des tubes à essais (5ml solution lactulose +5ml de solution résorcinol)
  - ❖ Chauffage pendant 20minutes
  - ❖ Lecture à 485nm
  - ❖ Répéter la même opération trois fois de l'ordre d'une série par jour

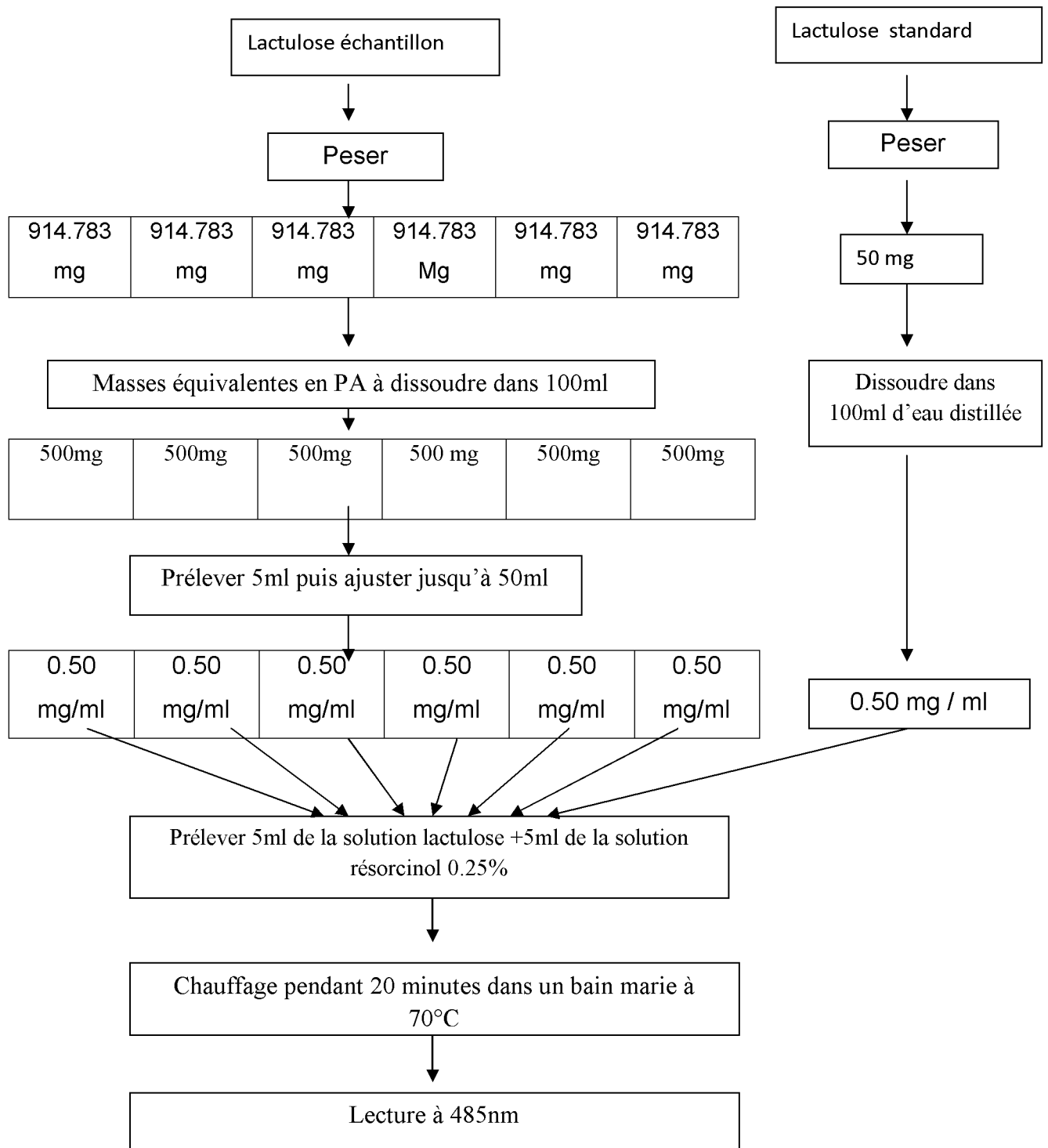


Figure 15 : Protocole expérimental de fidélité

**2.3.4.2 Etude statistique : Fidélité**

La démarche de l'analyse statistique est de démontrer statistiquement que la méthode est fidèle, autrement dit répétable et reproductible. La fidélité se calcule sur trois séries de sept mesures à 100% de la concentration théorique sur la forme pharmaceutique reconstituée.

❖ **Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement :**

**a - Système de référence considéré : droite D1 :**

- Transformation des données brutes en quantité retrouvées :

$$X_{ij} = \frac{y_{ij} - b_1}{a_1}$$

$a_1$  et  $b_1$  sont respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite de régression  $D_1$ , calculées dans le cadre de l'étude de la linéarité.

- Détermination des pourcentages de recouvrement :

$$Y_{ij} = \frac{X_{ij} \cdot 100}{x_{ij}}$$

**b. Système de référence considéré : Etalon 100% :**

- Transformation des données brutes en quantité retrouvées

$$Y_{ij} = X_{ij} / a_2$$

$a_2$  est la pente de la droite de régression  $D_1$ , calculée dans le cadre de l'étude de la linéarité.

- Détermination des pourcentages de recouvrement :

$$Y_{ij} = \frac{X_{ij} \cdot 100}{x_{ij}}$$

❖ **Moyenne des groupes :**

La moyenne  $m_j$  des  $n_j$  répétitions à l'intérieur du groupe  $j$  est donnée par :

- **Dispersion à l'intérieur des groupes de mesures :**

$$S_j^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - m_j)^2}{n_j - 1}$$

La variance des répétitions à l'intérieur du groupe j est donnée par :

$$m_j = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij}}{n_j}$$

Nombre de degrés de liberté **N DDL<sub>j</sub>=n<sub>j</sub>-1**

L'écart type à l'intérieur du groupe j est donné par  $S_j^2$ .

- **Variance de Répétabilité :**

– Sous réserve que les variances des k groupes de mesures forment un ensemble homogène, on peut calculer la variance de répétabilité par :

$$S_r^2 = \frac{\sum_{j=1}^k [(n_j - 1) \cdot S_j^2]}{(\sum_{j=1}^k n_j) - k}$$

Nombre de degrés de liberté

$$(\sum_{j=1}^k n_j) - k$$

Cet algorithme au cas général, pour lequel les groupes n'ont pas le même nombre de Mesures  $n_j$ .

– Lorsque tous les groupes ont le même nombre de mesures n :

$$S_r^2 = \frac{\sum_{j=1}^k S_j^2}{k}$$

- **Variance inter-groupes :**

➤ Cas général (le nombre de mesures est différent dans chaque groupe) : On peut calculer une variance inter-groupes  $S_g^2$  qui traduit la dispersion existant entre les moyennes  $m_j$  des groupes.

$$S_g^2 = \frac{\frac{\sum_{j=1}^k [n_j (m_j - \bar{m})^2]}{k-1}}{\bar{n}} - S_r^2$$

Dans cette relation,  $\bar{m}$  est la moyenne des moyennes des groupes, que l'on peut calculer par :

$$\bar{m} = \frac{\sum_{j=1}^k (n_j \cdot m_j)}{\sum_{j=1}^k n_j}$$

Enfin,  $\bar{n}$  est le nombre moyen de valeurs par groupe, donné par :

$$\bar{n} = \left[ \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{k} - \mathbf{1}} \right] \left[ \sum_{j=1}^k \mathbf{n}_j - \frac{\sum_{j=1}^k \mathbf{n}_j^2}{\sum_{j=1}^k \mathbf{n}_j} \right]$$

➤ Cas particulier où tous les groupes ont le même nombre de mesures  $n$  :

$$S_g^2 = \frac{\sum_{j=1}^k [(m_j - \bar{m})^2]}{k - 1} - \frac{S_r^2}{n}$$

$$\bar{m} = \frac{\sum_{j=1}^k m_j}{k}$$

$$\bar{n} = n$$

- **Variance totale :**

Elle est donnée par :

$$S_R^2 = S_r^2 + S_g^2$$

Il peut arriver que la valeur calculée pour  $S_g^2$  soit négative. Ce cas peut se produire lorsque la variabilité inter-groupes n'est pas significative vis-à-vis de la variance de répétabilité. Dans ce cas, on remplace par zéro la valeur négative trouvée.

- **Expression des résultats :**

Habituellement, on exprime les erreurs de répétabilité et totale sous forme de coefficients de variation.

-Répétabilité :

$$CV_r = \frac{100 \cdot S_r}{\bar{m}}$$

-Totale :

$$CV_R = \frac{100 \cdot S_R}{\bar{m}}$$

Les CV doivent être inférieurs à 2% pour dire que la méthode est fidèle.

### 2.3.5 Robustesse :

La robustesse est l'aptitude de la méthode à fournir des résultats avec de faibles variations en présence de faibles changements des conditions expérimentaux

Les paramètres que nous avons jugés comme étant susceptibles d'influer sur le résultat final sont : la teneur en substance à doser, la concentration en résorcinol, la T° de chauffage. [25]

### 2.3.5.1 Mode opératoire

L'objet du protocole est de faire varier les paramètres déjà cités, pour cela, il fallait utiliser la technique des plans factoriels, qui fait varier plusieurs paramètres au même temps, permettant ainsi de minimiser le nombre d'essais à effectuer, et d'étudier les interactions entre les paramètres.

Chaque facteur n'intervient qu'à deux niveaux, symbolisés par - ou + selon qu'ils prennent respectivement une valeur basse ou haute

Le 1<sup>er</sup> paramètre introduit est la teneur en substance à analyser, noté A (PA), en faisant des variations autour de deux niveaux de concentrations (niveau - = 95%, niveau + = 105%).

Le 2<sup>ème</sup> paramètre introduit est la concentration en résorcinol, noté B (niveau - = 0.2%, niveau+ = 0.3%).

Le 3<sup>ème</sup> paramètre introduit est la température de chauffage, noté C (niveau - = 60°C, niveau + = 80°C).

Les combinaisons réalisées sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau 9 : Ensemble d'étapes combinatoires permettant l'étude de la robustesse.**

N° essai		A Teneur en PA (mg/ml)	B Concentration en résorcinol (%)	C Température de chauffage (°C)
1	<b>Echantillon</b>	-	-	-
	<b>Standard</b>	/	-	-
2	<b>Echantillon</b>	+	-	-
	<b>Standard</b>	/	-	-
3	<b>Echantillon</b>	-	+	-
	<b>Standard</b>	/	+	-
4	<b>Echantillon</b>	+	+	-
	<b>Standard</b>	/	+	-
5	<b>Echantillon</b>	-	-	+
	<b>Standard</b>	/	-	+
6	<b>Echantillon</b>	+	-	+
	<b>Standard</b>	/	-	+
7	<b>Echantillon</b>	-	+	+
	<b>Standard</b>	/	+	+
8	<b>Echantillon</b>	+	+	+
	<b>Standard</b>	/	+	+

Chaque ligne correspond à une combinaison particulière des niveaux des paramètres opératoires, que l'on appelle « essai », chaque essai est répété une fois sur standard 100%, de façon à avoir un repère de comparaison, dans ce cas on aura 16 essais.

### 2.3.5.2 Etude statistique : robustesse

L'usage du plan factoriel  $2^3$  nous a permis d'étudier les trois paramètres ABC au même temps ainsi que leurs interactions de 2<sup>ème</sup> ordre (AB, AC, BC) et l'unique interaction de 3<sup>ème</sup> ordre (ABC).

L'étude statistique consiste en premier lieu au calcul des effets et interactions à partir des réponses mesurées et de la matrice d'expérience, qui sera suivi de la recherche de la significativité des effets. [24]

Par exemple, le calcul de l'effet B sera :

$$B = 1/8 (-y_1 - y_2 + y_3 + y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8)$$

Puis sa limite de confiance est ensuite établie :

$$B \pm t (S_{exp}D/\sqrt{8})$$

$S_{exp}$  est l'écart type expérimental des mesures,  $t$  est le coefficient de student. Si l'intervalle de confiance de l'effet d'un paramètre ou d'une interaction contient le zéro, l'effet de ce paramètre ou de cette interaction est considéré comme nul, si zéro est à l'extérieur de l'intervalle de la mesure, le résultat de la mesure est influencé par la variation des paramètres en cause. [26]

# CHAPITRE II

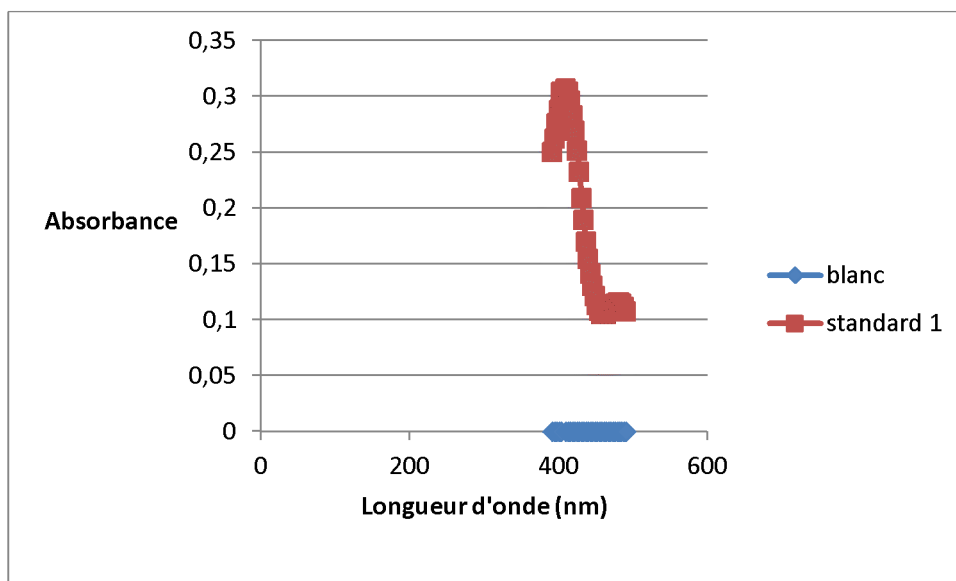
### 1. Mise au point et optimisation de la méthode :

#### 1.1 Choix de la longueur d'onde :

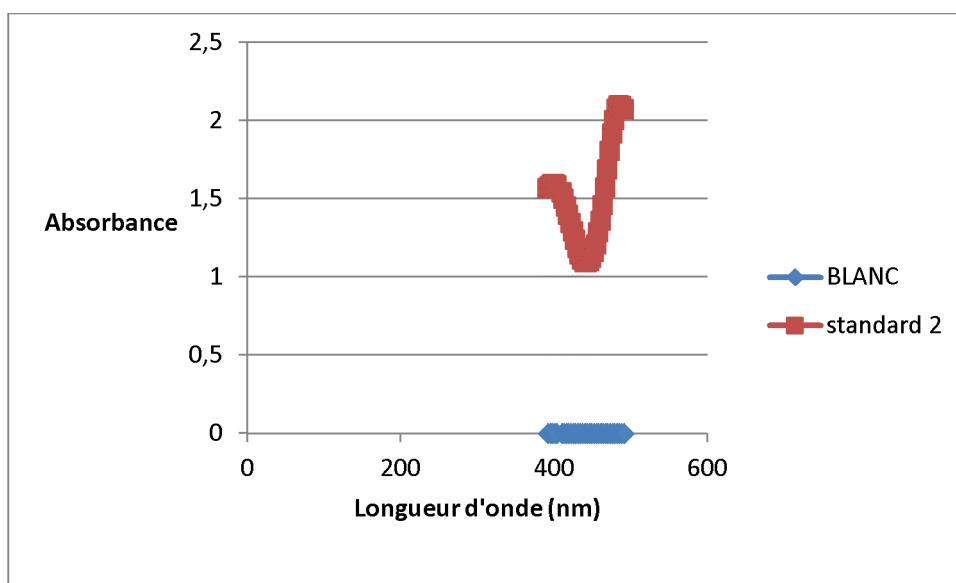
Le tableau suivant présente les absorbances à deux niveaux de concentrations standards 0.005 mg/ml (standard1) et 0.1 (standard 2) en mélangeant respectivement 5ml de celles-ci et 4ml de solution résorcinol à 0.05% et 1%.

**Tableau 10: Résultats des absorbances des complexes standard 1/ résorcinol 1%, standard 2 / résorcinol 0.05%.**

Lambda	résorcinol 0.05%		résorcinol 1 %	
	blanc	Standard 1	blanc	standard 2
392	0.003	0,25	0.000	1,567
395	0.003	0,262	0.000	1,583
398	0.003	0,276	0.000	1,593
401	0.003	0,288	0.001	1,594
404	0.003	0,298	0.001	1,587
404	0.003	0,304	0.002	1,568
410	0.004	0,307	0.002	1,539
413	0.003	0,304	0.002	1,498
416	0.002	0,296	0.001	1,449
419	0.002	0,283	0.001	1,396
422	0.002	0,269	0.001	1,344
425	0.001	0,251	0.001	1,29
428	0.001	0,232	0.001	1,239
431	0.001	0,209	0.001	1,183
434	0.000	0,189	0.001	1,141
437	0.000	0,17	0.001	1,11
440	0.000	0,154	0.001	1,094
443	0.000	0,141	0.001	1,092
446	0.000	0,13	0.001	1,101
449	0.000	0,121	0.000	1,121
452	0.001	0,113	0.000	1,159
455	0.001	0,108	0.000	1,208
458	0.001	0,105	0.000	1,285
461	0.001	0,105	0.000	1,362
464	0.002	0,105	0.000	1,457
467	0.002	0,107	0.000	1,575
470	0.002	0,109	0.001	1,686
473	0.002	0,112	0.001	1,806
476	0.003	0,114	0.001	1,916
479	0.003	0,115	0.001	2,003
482	0.003	0,115	0.002	2,076
485	0.004	0,114	0.002	2,096
488	0.003	0,111	0.000	2,092
491	0.002	0,107	0.000	2,072



**Figure 16: Spectre d'absorbances en fonction de la longueur d'onde pour le complexe réactionnel : résorcinol 0.05 %/ standard 1.**



**Figure 17 : Spectre d'absorbances en fonction de la longueur d'onde pour le complexe réactionnel : résorcinol 1%/ standard 2.**

D'après le spectre des absorbance des mélanges réactionnels standard1 /résorcinol 0.05% et standard 2/résorcinol 1% en fonction de la longueur d'onde (balayage de 392 à 492nm) ; on constate que dans les deux cas les pics se situent à 410nm et 485nm, mais les valeurs des absorbances sont meilleures à des concentrations plus élevées en lactulose et en résorcinol.

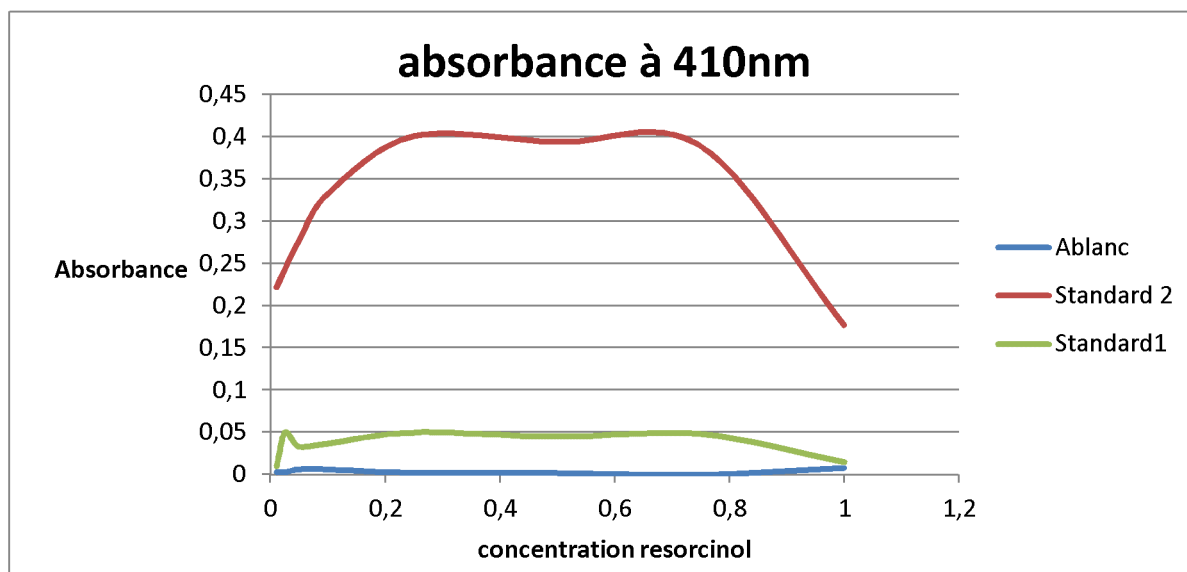
**1.2 Optimisation de la concentration en résorcinol :**

En faisant réagir les 5ml de standard 1 puis 5ml de standard 2 avec les 4ml de solutions résorcinol de concentrations croissantes, on obtient des absorbances qui sont récapitulées dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 11 : Absorbances à 410 nm de standard 1 et standard 2 en fonction de la concentration en résorcinol**

Concentration résorcinol(%)	Absorbance blanc	Absorbance standard 2	Absorbances standard 1
0,01	0,003	0,222	0,01
0,025	0,003	0,244	0,05
0,05	0,006	0,278	0,033
0,1	0,006	0,333	0,037
0,25	0,002	0,401	0,05
0,5	0,002	0,394	0,045
0,75	0	0,389	0,048
1	0,008	0,177	0,015

Les spectres des absorbances correspondant aux valeurs citées dans les tableaux précédents sont les suivants :



**Figure 18 : Absorbances à 410nm en fonction des concentrations en résorcinol pour standard 1 et standard 2.**

Tableau 12 : Absorbances à 485 nm de standard1 et standard2 en fonction de la concentration en résorcinol.

Concentration résorcinol	A blanc	A standard 2	A standard 1
0,001	0	0,278	0,017
0,025	0	0,31	0,036
0,05	0,001	0,335	0,026
0,1	0,002	0,429	0,031
0,25	0,004	0,521	0,048
0,5	0,003	0,513	0,047
0,75	0,003	0,47	0,042
1	0,006	0,485	0,01

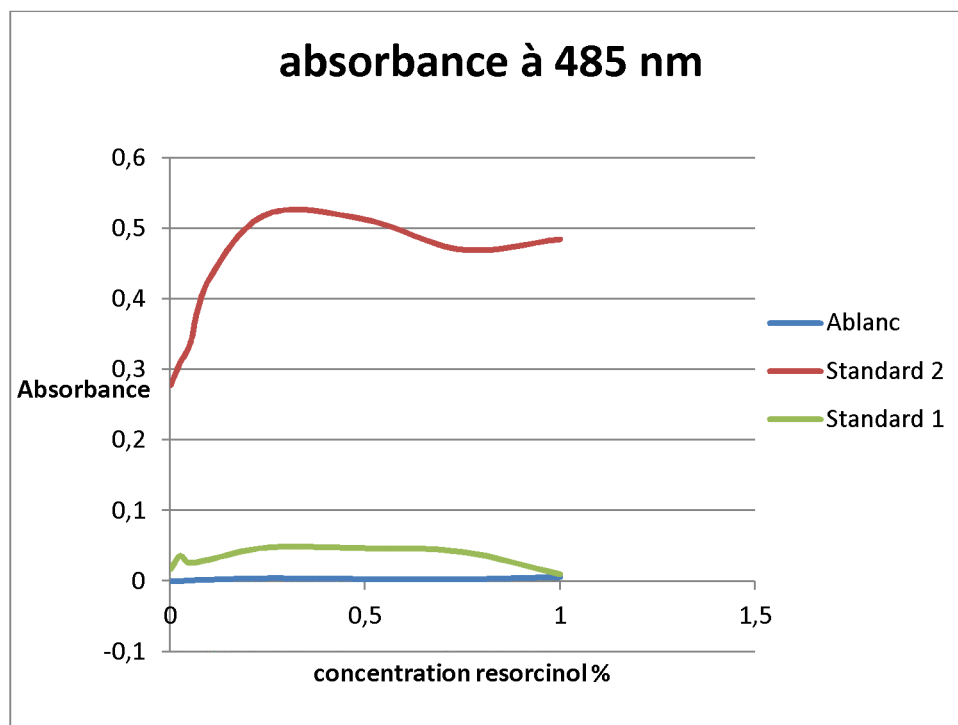


Figure 19: Absorbances à 485nm en fonction des concentrations en résorcinol pour standard 1 et standard 2.

Les spectres obtenues en faisant réagir le standard1 et le standard 2 avec de concentrations croissantes en résorcinol ; montrent deux pics l'un est autour de 0.25% et

l'autre autour de 0.75%, cela est juste pour les deux longueurs d'ondes optimisées précédemment pour des raisons de consommation on a choisit la concentration de 0.25%.

On remarque que les absorbances sont meilleures pour le standard 2 (C= 0.1 mg/ml) que le standard 1 (C= 0.005mg/ml)

A ce stade la méthode est optimisée tel que ;

-les longueurs d'ondes sont 410 nm et 485 nm.

-la concentration en résorcinol est de 0.25%.

-le volume de résorcinol à ajouter au milieu réactionnel est de 5ml au lieu de 4ml, cela est afin de minimiser les erreurs dus aux erreurs de prélèvement (plus précis de prélever 5 ml avec une pipette jaugée) lors des manipulations.

-la concentration de standard doit être optimisée, c'est l'objet de la prochaine étape.

### 1.3 Optimisation de la concentration de la solution standard :

Les absorbances obtenues suite aux réactions entre le lactulose standard avec ses différentes concentrations et le résorcinol 0.25% sont résumées dans le tableau suivant :

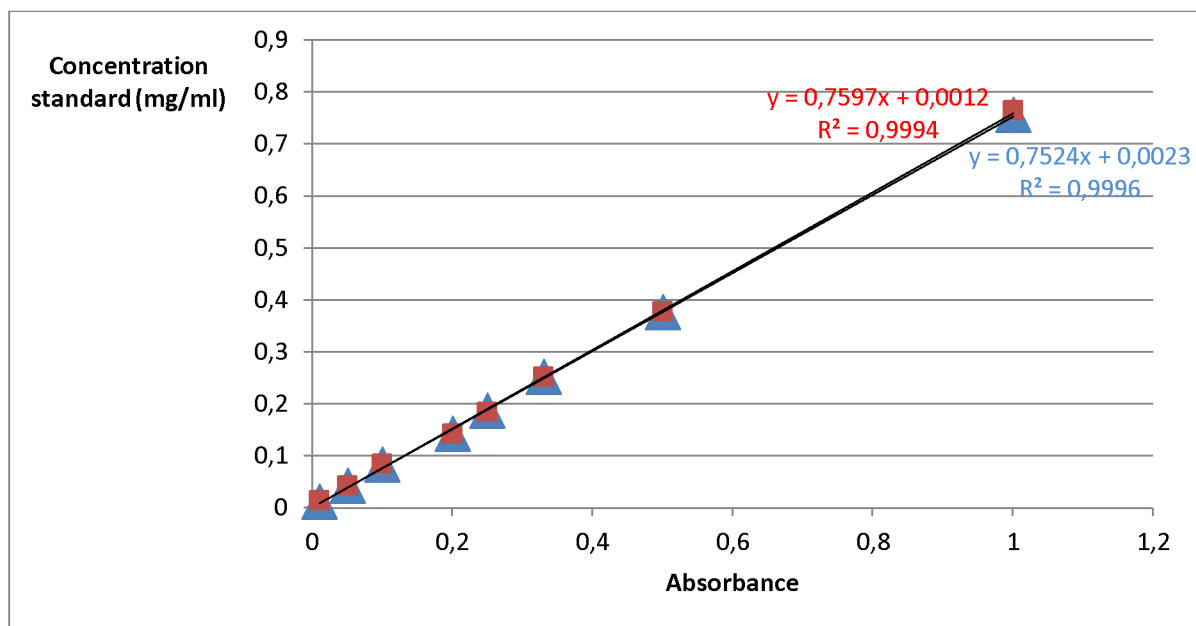
**Tableau 13 : Résultats obtenus suite à la réaction en fonction de la concentration en standard**

Concentration standard (mg/ml)	410(nm)	485(nm)
1	0,757	0,765
0,5	0,377	0,378
0,33	0,252	0,252
0,25	0,187	0,185
0,2	0,143	0,143
0,1	0,083	0,084
0,05	0,043	0,042
0,01	0,012	0,014

La courbe présentée ci-après est sous forme d'une droite, dont le coefficient de corrélation est de l'ordre de 0.999, cela implique que la relation « concentrations comprises

entre 0.01mg/ml et 1mg/ml/absorbances » est linéaire, celle-ci est valable pour la lecture à 410nm ainsi qu'à 485nm.

Le présent résultat nous donne la possibilité de lancer une gamme d'étalonnage autour d'une concentration donnée en lactulose comprise dans le domaine (0.01-1), le plus logique c'est de choisir la valeur centrale c.à.d. une concentration de 0.5mg/ml qui donne des absorbances assez significatives.



**Figure 20 : Courbe linéaire des absorbances en fonction de la concentration standard dans le domaine (0.01 -1) mg/ml.**

### 2. Validation analytique :

#### 2.1 Spécificité :

**Tableau 14 : Résultats d'étude de la spécificité.**

	blanc	placebo	Forme reconstituée	Solution standard
<b>Absorbance</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.434</b>	<b>0.438</b>
	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.436</b>	<b>0.437</b>
	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.435</b>	<b>0.436</b>
<b>Moyenne</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.335</b>	<b>0.337</b>

Les résultats présentés dans le tableau précédent montrent que les essais sur le blanc et le placebo n'interfèrent pas avec une des solutions standard ou échantillon dans les mêmes conditions expérimentales.

L'étude statistique de la spécificité sera réalisée lors de l'étude de la linéarité par la comparaison des pentes  $a_1$  et  $a_2$  des droites de régression  $D_1$  et  $D_2$  respectivement.

### 2.2 Linéarité :

#### 2.2.1 Traitement des données :

Les tableaux 15 et 16 présentent les résultats des trois jours obtenus pour la gamme principe actif et la gamme forme pharmaceutique reconstituée. Et à partir des données de ces tableaux, on trace pour chacune des deux gammes la droite de régression linéaire  $D_1$  et  $D_2$  qui sont représentées respectivement par les équations suivantes :

$$y_1 = a_1x + b_1$$

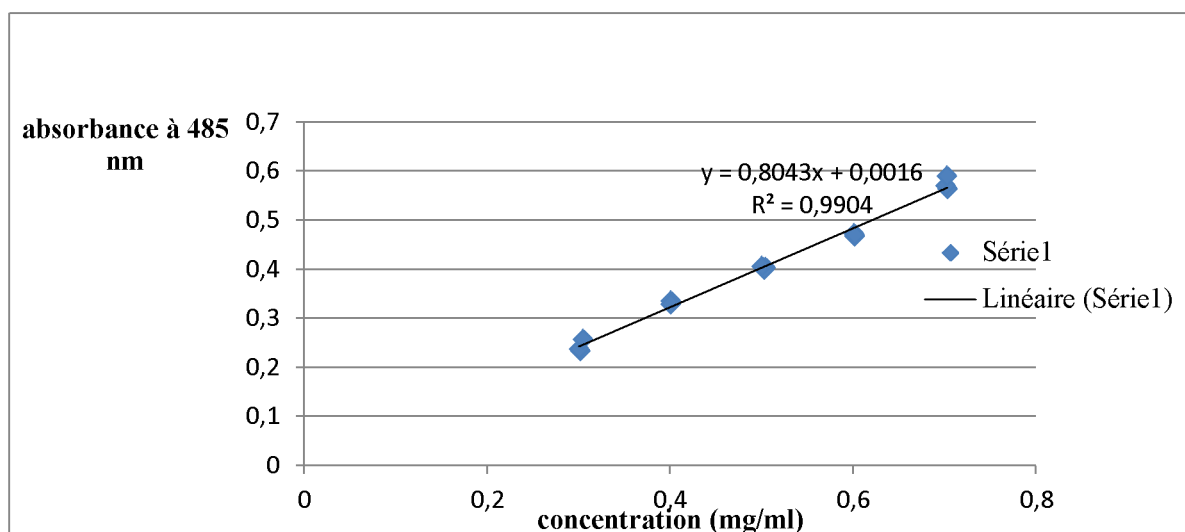
$$y_2 = a_2x + b_2$$

Soient :  $a_1$ ,  $a_2$  les pentes respectives des droites  $D_1$  et  $D_2$ , et  $b_1$ ,  $b_2$  leurs ordonnées à l'origine.

**Tableau 15: Linéarité ; résultats des trois séries sur standard.**

<b>Linéarité sur gamme standard</b>			
<b>% théorique</b>	<b>Concentration introduite (mg/ml)</b>	<b>Absorbance à 485 nm</b>	<b>Moyenne des trois lectures</b>
<b>60</b>	0,3017	0,234	0.243
	0,3001	0,238	
	0,3045	0,258	
<b>80</b>	0,4005	0,336	0.331
	0,4002	0,329	
	0,3999	0,329	
<b>100</b>	0,5042	0,404	0.403
	0,5022	0,399	
	0,4998	0,406	
<b>120</b>	0,6011	0,468	0.47
	0,6006	0,472	
	0,6014	0,47	
<b>140</b>	0,7027	0,565	0.575
	0,7003	0,571	
	0,7017	0,591	

Les résultats précédents ont permis de tracer la courbe suivante :

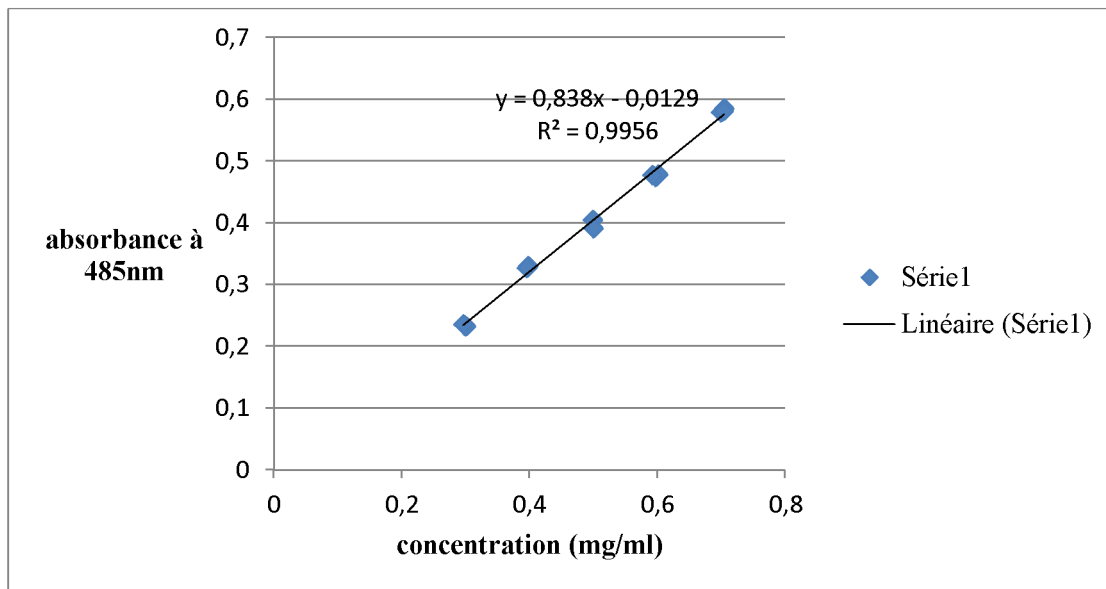


**Figure21 : Droite d'étalonnage sur le standard**

**Tableau 16 : Linéarité résultats des trois séries sur le placebo chargé (échantillon) :**

Linéarité sur gamme forme reconstituée			
% théorique	Concentration (mg/ml)	Absorbance à 485 nm	Moyenne des trois lectures
<b>60</b>	0,298321	0,234	0.234
	0,299983	0,233	
	0,295933	0,2363	
<b>80</b>	0,397613	0,33	0.328
	0,395896	0,328	
	0,394727	0,3273	
<b>100</b>	0,498522	0,405	0.4
	0,498522	0,405	
	0,499517	0,392	
<b>120</b>	0,596988	0,475	0.477
	0,600398	0,479	
	0,59126	0,4783	
<b>140</b>	0,703652	0,5857	0.581
	0,698744	0,5793	
	0,702576	0,581	

Les résultats présentés ci-dessus ont permis de tracer la courbe ci- après :



**Figure 22: Droite d'étalonnage sur le placebo chargé. (Fait par le logiciel Origin 6.0)**

### 2.2.2 Caractéristiques des droites de régression $D_1$ et $D_2$ :

Les résultats obtenus pour les trois paramètres pente, ordonnée et coefficient de corrélation sont regroupés dans le tableau 17.

**Tableau 17 : Résultats des calculs des paramètres de la droite de régression.**

Pente de la droite sur standard: $a_1 =$	<b>0,80432526</b>	Pente de la droite sur FR : $a_2 =$	<b>0,838012309</b>
SCE/n-2	<b>0,000136671</b>	SCE/n-2	<b>7,26E-05</b>
Erreur pente $\delta_{a1} =$	<b>0,021347991</b>	Erreur pente $\Delta_{a2} =$	<b>0,015438828</b>
Ordonnée à l'origine $b_1 =$	<b>0,001627788</b>	Ordonnée à l'origine $b_2 =$	<b>-0,01287829</b>
Erreur ordonnée $\delta_{b1} =$	<b>0,011121217</b>	Erreur ordonnée $\Delta_{b2} =$	<b>0,007999647</b>
Coefficient de corrélation $r_1$	<b>0.9904</b>	Coefficient de corrélation $r_2$	<b>0.9956</b>

A partir du tableau, les droites de régression  $D_1$  et  $D_2$  correspondantes sont respectivement:

$$D_1 : y_1 = 0.8043 x + 0.00162, r_1 = 0.9904$$

$$D_2 : y_2 = 0.8380 x - 0.01287, r_2 = 0.9956$$

Les résultats de calcul des coefficients de corrélation sont satisfaisants ( $r \geq 0.99$ ).

**2.2.3 Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec zéro :**

Les résultats des tests de comparaison des pentes et ordonnées à l'origine avec zéro pour le standard et la forme reconstituée sont résumés dans les tableaux suivants ;

**Tableau 18: Linéarité : comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec zéro pour le standard.**

<b>Linéarité sur gamme standard</b>				
<b>% théorique</b>	<b>Concentration introduite (mg/ml)</b>	<b>Absorbance</b>	<b>(yi-y*)<sup>2</sup></b>	<b>(xi-x')<sup>2</sup></b>
80	0,3017	0,234	S	0,0398774
	0,3001	0,238	2,51E-05	0,040519
	0,3045	0,258	0,0001312	0,038767
90	0,4005	0,336	0,0001498	0,0101795
	0,4002	0,3297	3,78E-05	0,0102401
	0,3999	0,329	3,27E-05	0,0103009
100	0,5042	0,4043	8,04E-06	7,88E-06
	0,5022	0,3997	3,47E-05	6,51E-07
	0,4998	0,406	5,62E-06	2,54E-06
110	0,6011	0,4683	0,0002814	0,0099414
	0,6006	0,4727	0,0001449	0,009842
	0,6014	0,47	0,0002356	0,0100013
120	0,7027	0,565	3,34E-06	0,0405244
	0,7003	0,5717	4,58E-05	0,0395639
	0,7017	0,5913	0,0006406	0,0401228
<b>Comparaison de la pente a<sub>1</sub> avec 0</b>		t calculé	37,677	
		t° (0,05, 13)	2,145	
		Condition	t calculé > t°	
<b>Comparaison de l'ordonnée à l'origine b<sub>1</sub> avec 0</b>		t calculé	0,146	
		t° (0,05, 13)	2,145	
		Condition	t calculé < t°	

- Comparaison de la pente  $a_1$  avec zéro :

Le  $t$  calculé  $> t^\circ$  (0,05, 13) cela implique que la pente  $a_1$  de la droite  $D_1$  n'est pas significativement différente de zéro au seuil de probabilité de 5%.

- Comparaison de l'ordonnée à l'origine  $b_1$  avec zéro :

Le  $t$  calculé  $< t^\circ$  (0,05, 13) cela implique que l'ordonnée à l'origine  $b_1$  de la droite de régression  $D_1$  n'est pas significativement différente de zéro au seuil de probabilité de 5%.

**Tableau 19 : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec zéro pour la forme reconstituée.** (Calculs faits sur feuille Excel. D<sup>r</sup> MAMOU)

Linéarité sur gamme placebo chargé				
% théorique	Concentration introduite (mg/ml)	Absorbance	$(y_i - y^*)^2$	$(x_i - x')^2$
60	0,298321	0,234	9,72E-06	0,03994234
	0,299983	0,233	3,04E-05	0,03928078
	0,295933	0,2363	1,48E-06	0,04090255
80	0,397613	0,33	9,36E-05	0,01011308
	0,395896	0,328	8,30E-05	0,01046136
	0,394727	0,3273	8,88E-05	0,01070186
100	0,498522	0,405	1,23E-08	1,19E-07
	0,498522	0,405	1,23E-08	1,19E-07
	0,499517	0,392	0,00018832	1,80E-06
120	0,596988	0,475	0,00015388	0,00976365
	0,600398	0,479	0,00012685	0,01044917
	0,59126	0,4783	1,82E-05	0,00866448
140	0,703652	0,5857	7,88E-05	0,04222006
	0,698744	0,5793	4,43E-05	0,0402272
	0,702576	0,581	2,61E-05	0,04177903
Comparaison de la pente $a_2$ avec 0		t calculé	54,28	
		$t^\circ$ (0,05, 14)	2,145	
		Condition	t calculé $>$ $t^\circ$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine $b_2$ avec 0		t calculé	1,61	
		$t^\circ$ (0,05, 14)	2,145	
		Condition	t calculé $<$ $t^\circ$	

- Comparaison de la pente  $a_2$  avec zéro :

Le  $t$  calculé  $> t^\circ (0.05, 14)$  donc la pente  $a_2$  de la droite de régression  $D_2$  est significativement différente de zéro.

- Comparaison de l'ordonnée à l'origine  $b_2$  avec zéro :

Le  $t$  calculé  $< t^\circ (0.05, 14)$  donc l'ordonnée à l'origine  $b_2$  de la droite  $D_2$  n'est pas significativement différente de zéro.

**2.2.4 Comparaison des pentes  $a_1$  et  $a_2$  des droites  $D_1$  et  $D_2$  respectivement :**

**Tableau 20 : Comparaison des pentes  $a_1$  et  $a_2$ .**

<b>Comparaison des pentes <math>a_1</math> et <math>a_2</math> : METHODE SPECIFIQUE</b>	t calculé	1,279
	$t^\circ (0,05, 29)$	2,045
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (0,05, 29)$

Le  $t$  calculé  $< t^\circ$  ce qui implique que les pentes  $a_1$  et  $a_2$  des droite de régression  $D_1$  et  $D_2$  respectivement ne sont pas significativement différentes. Donc il y'a absence d'effet matrice, la méthode est dite **spécifique**.

**2.2.5 Comparaison des ordonnées à l'origine  $b_1$  et  $b_2$  :**

**Tableau 21 : Comparaison des ordonnées à l'origine  $b_1$  et  $b_2$ .**

<b>Comparaison des ordonnées à l'origine <math>b_1</math> et <math>b_2</math> : ABSENCE D'ERREURS SYSTEMATIQUES</b>	t calculé	1,059
	$t^\circ (0,05, 29)$	2,045
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (0,05, 29)$

Le  $t$  calculé  $< t^\circ (0.05, 29)$  donc les ordonnées à l'origine  $b_1$  et  $b_2$  des droites  $D_1$  et  $D_2$  ne sont pas significativement différentes, cela implique l'absence d'erreurs systématiques.

**2.2.6 Test d'homogénéités des variances et existence d'une pente significative :**

Les résultats des tests d'homogénéités des variances et l'existence d'une pente significative du standard et le placebo chargé sont récapitulés dans les tableaux suivants ;

**Tableau 22 : Résultats des tests d'homogénéités des variances sur standard**

Linéarité sur gamme standard					Homogénéité des variances		
% théorique	Masse introduite (Concentration)	Absorbance	Moyenne xi	YNij	Variance du groupe	C calculé	C° (0,05, 5,2)
60	0,3017	0,234	0,302	0,2343217	0,0001286	0,54	0,68
	0,3001	0,238		0,2396087			
	0,3045	0,258		0,2560696			
80	0,4005	0,336	0,4	0,3357587	1,33E-05		
	0,4002	0,33		0,3296667			
	0,3999	0,329		0,3292413			
100	0,5042	0,404	0,502	0,4026174	1,75E-05		
	0,5022	0,4		0,3995594			
	0,4998	0,406		0,4078231			
120	0,6011	0,468	0,601	0,4682797	5,90E-06		
	0,6006	0,473		0,4730152			
	0,6014	0,47		0,4697051			
140	0,7027	0,565	0,702	0,5640884	0,0001924		
	0,7003	0,572		0,5726855			
	0,7017	0,591		0,5912261			
<b>Pente</b>	<b>0,80432526</b>			<b>Moyenne YNi'</b>			
<b>Ordonnée</b>	<b>0,001627788</b>			<b>0,4049111</b>			

Tableau 23 : Résultats du test de l'existence d'une pente significative sur standard

Calcul des variabilités totales, due à la régression résiduelle				Existence de pente significative			
$(Y_{N_{ij}} - Y_{N'_i})^2$	$Y_{N_{ig}^*}$	$(Y_{N_{ij}} - Y_{N_{ig}^*})^2$	$(Y_{N_{ig}^*} - Y_{N'_i})^2$	Variance due à la régression $S_I^2$	Variance résiduelle $S_R^2$	F calculé = $S_I^2/S_R^2$	F° (0,05, 1, 13)
0,02910074	0,24461445	0,00010594	0,02569502	0,1939961	0,0001448	1339,56	4,67
0,0273249	0,24461445	2,51E-05	0,02569502				
0,02215379	0,24461445	0,00013122	0,02569502				
0,00478206	0,32351876	0,00014982	0,00662472				
0,00566173	0,32351876	3,78E-05	0,00662472				
0,00572592	0,32351876	3,27E-05	0,00662472				
5,26E-06	0,40545269	8,04E-06	2,93E-07				
2,86E-05	0,40545269	3,47E-05	2,93E-07				
8,48E-06	0,40545269	5,62E-06	2,93E-07				
0,00401558	0,48505408	0,00028138	0,0064229				
0,00463817	0,48505408	0,00014493	0,0064229				
0,00419826	0,48505408	0,00023559	0,0064229				
0,02533742	0,56591558	3,34E-06	0,02592244				
0,02814824	0,56591558	4,58E-05	0,02592244				
0,03471327	0,56591558	0,00064062	0,02592244				
Variabilité totale $\Sigma T^2$	Moyenne $Y_{N^*i'}$	Variabilité résiduelle $\Sigma R^2$	Variabilité due à la régression $\Sigma I^2$				
<b>0,1958424</b>	<b>0,40491111</b>	<b>0,001883</b>	<b>0,1939961</b>				

- Homogénéité des variances :

Le C calculé  $< C^\circ$  (0.05, 5, 2) donc l'ensemble des variances des cinq groupes peut être considéré comme homogène au seuil de 95%.

- Existence d'une pente significative :

Le F calculé  $> F^\circ$  (0.05, 1,13) cela implique que les variances résiduelles sont insignifiantes par rapport aux variances de régression au seuil de 95%.

**Tableau 24 : Résultats des tests de l'homogénéité des variances sur la forme reconstituée.**

Linéarité sur forme reconstitué					Homogénéité des variances		
% théorique	Concentration introduite (mg/ml)	Absorbance	Moyenne $\bar{x}_i$	Y <sub>Nij</sub>	Variance du groupe	C calculé	C° (0,05, 5,2)
60	0,298321	0,234	0,298079	0,2337972	1,16E-05	0,65	0,68
	0,299983	0,233		0,2314044			
	0,295933	0,2363		0,2381317			
80	0,397613	0,33	0,39607867	0,3287142	7,91E-08		
	0,395896	0,328		0,3281531			
	0,394727	0,3273		0,328466			
100	0,498522	0,405	0,49885367	0,4052779	6,38E-05		
	0,498522	0,405		0,4052779			
	0,499517	0,392		0,3914441			
120	0,596988	0,475	0,59621533	0,4743525	1,94E-05		
	0,600398	0,479		0,4754949			
	0,59126	0,4783		0,482486			
140	0,703652	0,5857	0,70165733	0,5839951	3,58E-06		
	0,698744	0,5793		0,5817747			
	0,702576	0,581		0,5802301			
<b>Pente</b>	<b>0,838012309</b>			<b>Moyenne Y<sub>Ni'</sub></b>			
<b>Ordonnée</b>	<b>-0,01287829</b>			<b>0,4046</b>			

**Tableau 25 : Résultats des tests d'existence d'une pente significative sur forme reconstituée.**

Calcul des variabilités totales, due à la régression résiduelle				Existence de pente significative			
$(Y_{N_{ij}} - Y_{N'_i})^2$	$Y_{N_{ig}^*}$	$(Y_{N_{ij}} - Y_{N_{ig}^*})^2$	$(Y_{N_{ig}^*} - Y_{N'_i})^2$	Variance due à la régression $S_I^2$	Variance résiduelle $S_R^2$	F calculé = $S_I^2/S_R^2$	$F^\circ (0,05, 1, 13)$
0,0291736	0,23691558	9,72E-06	0,02811807	0,2137964	7,26E-05	2945,6	4,67
0,02999671	0,23691558	3,04E-05	0,02811807				
0,02771169	0,23691558	1,48E-06	0,02811807				
0,00575865	0,31904051	9,36E-05	0,00732043				
0,00584413	0,31904051	8,30E-05	0,00732043				
0,00579638	0,31904051	8,88E-05	0,00732043				
4,60E-07	0,40516722	1,23E-08	3,22E-07				
4,60E-07	0,40516722	1,23E-08	3,22E-07				
0,00017308	0,40516722	0,00018832	3,22E-07				
0,00486541	0,4867575	0,00015388	0,00674985				
0,00502608	0,4867575	0,00012685	0,00674985				
0,00606622	0,4867575	1,82E-05	0,00674985				
0,03218261	0,57511919	7,88E-05	0,0290768				
0,03139089	0,57511919	4,43E-05	0,0290768				
0,03084595	0,57511919	2,61E-05	0,0290768				
<b>Variabilité totale <math>\Sigma T^2</math></b>	<b>Moyenne <math>Y_{N^*i'}</math></b>	<b>Variabilité résiduelle <math>\Sigma R^2</math></b>	<b>Variabilité due à la régression <math>\Sigma I^2</math></b>				
<b>0,2148323</b>	<b>0,4046</b>	<b>0,000944</b>	<b>0,2137964</b>				

- Homogénéité des variances :

Le  $t$  calculé  $< t^\circ$  donc l'ensemble des variances des cinq groupes peut être considéré comme homogène au seuil de 95%.

- Existence d'une pente significative :

Le  $F$  calculé  $> F^\circ$  cela implique que les variances résiduelles sont insignifiantes par rapport aux variances de régression au seuil de 95%.

### **2.2.7 Test de validité de la droite de régression :**

Les résultats du test de la validité de la droite de régression sur le standard et le placebo chargé sont représentés dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 26 : Résultats du test validité de la droite de régression sur standard.**

Linéarité sur gamme standard						
% de concentration		Concentration introduite (mg/ml)	Absorbance	Moyenne xi	YN <sub>i</sub>	
60		0,3017	0,234	0,3021	0,23432173	
		0,3001	0,238		0,23960865	
		0,3045	0,258		0,25606962	
80		0,4005	0,336	0,4002	0,3357587	
		0,4002	0,3297		0,32966667	
		0,3999	0,329		0,3292413	
100		0,5042	0,4043	0,5021	0,40261744	
		0,5022	0,3997		0,39955942	
		0,4998	0,406		0,40782314	
120		0,6011	0,4683	0,601	0,46827971	
		0,6006	0,4727		0,47301521	
		0,6014	0,47		0,46970508	
140		0,7027	0,565	0,7016	0,56408843	
		0,7003	0,5717		0,57268548	
		0,7017	0,5913		0,59122609	
<b>Pente</b>		<b>0,80432526</b>			<b>Moyenne YNi'</b>	
<b>Ordonnée</b>		<b>0,001627788</b>			<b>0,40491111</b>	
Calcul des variabilités expérimentales et d'ajustement			Validité de la droite de régression			
YN' <sub>ig</sub>	(YN <sub>i</sub> - YN' <sub>ig</sub> ) <sup>2</sup>	(YN <sub>i</sub> * - YN' <sub>ig</sub> ) <sup>2</sup>	Variance expérimentale S <sub>E</sub> <sup>2</sup>	Variance d'ajustement S <sub>L</sub> <sup>2</sup>	F calculé = S <sub>I</sub> <sup>2</sup> /S <sub>R</sub> <sup>2</sup>	F° (0,05, 1, 13)
0,236	2,82E-06	7,42E-05	0,00010633	0,00039056	3,67	4,67
	1,30E-05	7,42E-05				
	0,00040279	7,42E-05				
0,33283333	8,56E-06	8,68E-05				
	1,00E-05	8,68E-05				
	1,29E-05	8,68E-05				
0,402	3,81E-07	1,19E-05				
	5,96E-06	1,19E-05				
	3,39E-05	1,19E-05				
0,4705	4,93E-06	0,000211821				
	6,33E-06	0,000211821				
	6,32E-07	0,000211821				
0,56833333	1,80E-05	5,85E-06				
	1,89E-05	5,85E-06				
	0,00052408	5,85E-06				
<b>Variabilité résiduelle Σ R<sup>2</sup></b>		<b>Variabilité due à la régression Σ P<sup>2</sup></b>				

0,000944	0,21379639
----------	------------

Le F calculé < F° (0.05, 1, 13) donc le F est non significatif, on conclut que l'ajustement est considéré comme valide au seuil de 95% ;

**Tableau 27: Résultats du test validité de la droite de régression sur la forme reconstituée**

Linéarité sur forme reconstituée						
% de concentration	Concentration introduite (mg/ml)		Absorbance	Moyenne xi	YN <sub>i</sub>	
60	0,3017		0,234	0,3021	0,23432173	
	0,3001		0,238		0,23960865	
	0,3045		0,258		0,25606962	
80	0,4005		0,336	0,4002	0,3357587	
	0,4002		0,3297		0,32966667	
	0,3999		0,329		0,3292413	
100	0,5042		0,4043	0,5021	0,40261744	
	0,5022		0,3997		0,39955942	
	0,4998		0,406		0,40782314	
120	0,6011		0,4683	0,601	0,46827971	
	0,6006		0,4727		0,47301521	
	0,6014		0,47		0,46970508	
140	0,7027		0,565	0,7016	0,56408843	
	0,7003		0,5717		0,57268548	
	0,7017		0,5913		0,59122609	
<b>Pente</b>	<b>0,80432526</b>				<b>Moyenne YNi'</b>	
<b>Ordonnée</b>	<b>0,001627788</b>				<b>0,40491111</b>	
Calcul des variabilités expérimentales et d'ajustement			Validité de la droite de régression			
YN' <sub>ig</sub>	(YN <sub>i</sub> - YN' <sub>ig</sub> ) <sup>2</sup>	(YN <sub>i</sub> * - YN' <sub>ig</sub> ) <sup>2</sup>	Variance expérimentale S <sub>E</sub> <sup>2</sup>	Variance d'ajustement S <sub>L</sub> <sup>2</sup>	F calculé = SP <sup>2</sup> /SR <sup>2</sup>	F° (0,05, 1, 13)
0,236	2,82E-06	7,42E-05	0,00010633	0,00039056	3,67	4,67
	1,30E-05	7,42E-05				
	0,00040279	7,42E-05				
0,33283333	8,56E-06	8,68E-05				
	1,00E-05	8,68E-05				
	1,29E-05	8,68E-05				
0,402	3,81E-07	1,19E-05				
	5,96E-06	1,19E-05				
	3,39E-05	1,19E-05				
0,4705	4,93E-06	0,00021182				

	6,33E-06	0,00021182			
	6,32E-07	0,00021182			
0,56833333	1,80E-05	5,85E-06			
	1,89E-05	5,85E-06			
	0,00052408	5,85E-06			
	<b>Variabilité Expérimentale <math>\Sigma E^2</math></b>	<b>Variabilité d'ajustement <math>\Sigma</math> <math>L^2</math></b>			
	<b>0,0010633</b>	<b>0,0011717</b>			

Le F calculé <  $F^\circ(0.05, 1, 13)$  donc le F est non significatif, on conclut que l'ajustement est considéré comme valide au seuil de 95% ;

### **2.3 Exactitude :**

Etant donné que les ordonnées à l'origine de droites  $D_1$  et  $D_2$  sont pas significativement différentes de zéro, le système de référence considéré est l'étalon 100%.

#### **2.3.1 Vérification de l'homogénéité des variances liées :**

Le tableau suivant résume l'ensemble des calculs effectués pour vérifier l'homogénéité des variances liées.

**Tableau 28 : Résultats du test de vérification de l'homogénéité des variances liées.**

Linéarité sur gamme standard			Linéarité sur FR	
% théorique	Concentration introduite (mg/ml)	absorbance	Concentration introduite (mg/ml)	absorbance
60	0,3017	0,234	0,298321	0,234
	0,3001	0,238	0,299983	0,233
	0,3045	0,258	0,295933	0,2363
80	0,4005	0,336	0,397613	0,33
	0,4002	0,3297	0,395896	0,328
	0,3999	0,329	0,394727	0,3273
100	0,5042	0,4043	0,498522	0,405
	0,5022	0,3997	0,498522	0,405
	0,4998	0,406	0,499517	0,392
120	0,6011	0,4683	0,596988	0,475
	0,6006	0,4727	0,600398	0,479
	0,6014	0,47	0,59126	0,4783
140	0,7027	0,565	0,703652	0,5857
	0,7003	0,5717	0,698744	0,5793
	0,7017	0,5913	0,702576	0,581
Concentration estimée (xi')	Index de recouvrement	Variance du groupe	C Calculé	C° (0,05, 5,2)
0,2889	96,84	1,895	0,58	0,68
0,28766	95,89			
0,2918	98,6			
0,40826	102,68	0,008		
0,40577	102,49			
0,40494	102,59			
0,5015	100,6	3,935		
0,5015	100,6			
0,48534	97,16			
0,58853	98,58	0,79		
0,59351	98,85			

## Chapitre II : Résultats et discussion

0,59268	100,24		
0,72612	103,19	0,113	
0,71825	102,79		
0,72032	102,53		

Le C calculé < C° ; donc l'ensemble des variances des différents groupes peut être considéré comme homogène au risque de 5%.

### 2.3.2 Test de validité des moyennes :

**Tableau 29 : Résultats du test validité des moyennes.**

Moyenne du groupe	Variance intra groupe	Variance inter groupe	F Calculé	F° (0,01, 10,4)	Index de recouvrement
97,11	1,348	17,76	13,17	14,54	96,84
					95,89
					98,6
					102,68
102,59					102,49
					102,59
					100,6
99,45					100,6
					97,16
					98,58
99,23	98,85				
	100,24				
	103,19				
102,84	102,79				
	102,53				
				<b>Moyenne</b>	<b>100,24</b>
				<b>Ecart type</b>	<b>2,46</b>

F calculé < F° ; donc F calculé n'est pas significatif, on peut dire qu'au seuil de probabilité de 5 %, le facteur groupe n'a pas d'influence sur les moyennes et il n'y a pas de différence

statistiquement significative, donc les variations des observations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentales.

### 2.3.3 Test de recouvrement moyen :

**Tableau 30 : Exactitude : estimation de l'intervalle de confiance de recouvrement moyen.**

<b>Limite inférieure de l'Intervalle de Confiance</b>	<b>98,88</b>
<b>Limite supérieure de l'Intervalle de Confiance</b>	<b>101,6</b>

La valeur de 100% est incluse dans l'intervalle de confiance de recouvrement moyen [98,88% ; 101,60%], ce qui permet de conclure à l'exactitude de la méthode.

### 2.4 Fidélité :

#### 2.4.1 Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement :

La transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement pour les trois séries d'analyse effectuées pour l'étude de la fidélité sont représentées dans les tableaux

**Tableau 31 : Résultats de Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement : Système de référence considéré : Etalon 100%, série 1**

<b>Fidélité : SERIE 1</b>			
<b>N</b>	<b>Concentration standard (mg/ml)</b>		<b>0,5008</b>
	<b>Absorbance standard</b>		<b>0,411</b>
	<b>Concentration introduite (mg/ml)</b>	<b>Absorbance</b>	<b>% de recouvrement</b>
<b>1</b>	0,497	0,412	101,01
<b>2</b>	0,4987	0,414	101,154
<b>3</b>	0,4998	0,413	100,688
<b>4</b>	0,5039	0,416	100,594
<b>5</b>	0,4972	0,417	102,194
<b>6</b>	0,497	0,415	101,745

**Tableau 32: Résultats de Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement : Système de référence considéré : Etalon 100%, série 2**

<b>Fidélité : SERIE 2</b>			
<b>N</b>	<b>Concentration standard (mg/ml)</b>		<b>0,5027</b>
	<b>Absorbance standard</b>		<b>0,424</b>
	<b>Concentration introduite</b>	<b>Absorbance</b>	<b>% de recouvrement</b>
<b>1</b>	0,5	0,423	100,605
<b>2</b>	0,5	0,423	100,063
<b>3</b>	0,5	0,419	99,814
<b>4</b>	0,5	0,425	100,556
<b>5</b>	0,5	0,425	101,04
<b>6</b>	0,5	0,422	99,926

**Tableau 33: Résultats de Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement : Système de référence considéré : Etalon 100%, série 3**

<b>Fidélité : SERIE 3</b>			
	<b>Concentration standard (mg/ml)</b>		<b>0,5016</b>
	<b>Absorbance standard</b>		<b>0,416</b>
	<b>Concentration introduite (mg/ml)</b>	<b>Absorbance</b>	<b>% de recouvrement</b>
<b>1</b>	0,5	0,418	100,102
<b>2</b>	0,5	0,419	101,124
<b>3</b>	0,5	0,411	99,652
<b>4</b>	0,5	0,42	101,61
<b>5</b>	0,5	0,425	101,96
<b>6</b>	0,5	0,424	101,68

**2.4.2 Etude statistique : Fidélité :**

Les résultats des études de la moyenne des groupes, la dispersion à l'intérieur des groupes de mesures, la variance et la répétabilité, la variance inter groupes ainsi que la variance totale sont représentés dans le tableau ci- dessous :

Tableau 34: Etude statistique de la fidélité.

ETUDE STATISTIQUE DE LA FIDELITE					
N	Pourcentages de recouvrement			Nombre de groupes K	3
	SERIE 1	SERIE 2	SERIE 3	Nombre de mesure / groupe	6
1	101,01	100,605	100,102	$T1 = \sum n_j m_j$	1820,106
2	101,154	100,063	101,124	$T2 = \sum n_j m_j^2$	184056,38
3	100,688	99,814	99,652	$T3 = \sum S_j^2$	1,494
4	100,594	100,556	101,61	$T4 = \sum (m_j - m')^2 / k - 1$	0,22
5	102,194	101,04	101,96	Variance de Répétabilité : $S^2_r = T3/K$	0,498
6	101,745	99,926	101,68	Variance inter groupe $S^2_g = T4 - S^2_r / 6$	0,137
Variance du groupe	0,39	0,226	0,878	Variance inter groupe $S^2_g = T3 - S^2_r / 7$	0,137
C calculé	0,588			Variance de fidélité $S^2_R = S^2_r + S^2_g$	0,635
C° (0,05, 3, 6)	0,677			CV Répétabilité 100 Sr/m'	0,7
Moyenne du groupe	101,231	100,334	101,021	CV de fidélité 100 Sr/m'	0,79
Variance intra groupe	0,498				
Variance inter groupe	1,321				
F calculé	2,653				
F° (0,05, 15, 2)	3,682				

- Le C calculé < C°, donc l'ensemble des variances des différents groupes peut être considéré comme homogène ;
- Le F calculé < F°, donc les variations entre les différents groupes au risque 5% sont dues aux erreurs expérimentales
- Les coefficients de variation de la répétabilité et d'intergroupes sont inférieurs à 2%, ce qui démontre la fidélité de la méthode analytique pour la détermination de la teneur en lactulose dans un sirop laxatif.

**2.3 Robustesse :**

Pour étudier l'effet de chaque paramètre ainsi que ses interactions avec les autres, on a réalisé le plan factoriel suivant :

**Tableau 35: Matrice des effets d'un plan factoriel 2<sup>3</sup>**

Essai	Facteurs			Interactions			
	A (teneur en %)	B (Concentration en résorcinol (g/100ml)	C Température	AB	AC	BC	ABC
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	1
4	1	1	-1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	1	-1	1
6	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
<b>Niveau bas</b>	<b>95%</b>	<b>0,2</b>	<b>60</b>				
<b>Niveau haut</b>	<b>105%</b>	<b>0,3</b>	<b>80</b>				

**Tableau 36: Plan d'expérience à trois facteurs et calcul d'écart type**

concentration pour une teneur théorique de 100% = 0.5 mg/ml										
N° de l'essai	A (teneur en %)	B (Concentration en résorcinol (g/100ml))	C Température	Concentration introduite (mg/ml) - Echantillon	Concentration - Standard (mg/ml)	Teneur introduite (%)	Absorbance échantillon	Absorbance standard	Concentration estimée (mg/ml)	Réponse (Teneur en %)
1	95%	0,2	60	0,47623	0,51	95,25	<b>0,155</b>	<b>0,162</b>	0,486	97,25
2	105%	0,2	60	0,52555	0,51	105,11	<b>0,17</b>	<b>0,159</b>	0,543	108,67
3	95%	0,3	60	0,47623	0,51	95,25	<b>0,119</b>	<b>0,125</b>	0,484	96,76
4	105%	0,3	60	0,52555	0,51	105,11	<b>0,145</b>	<b>0,13</b>	0,567	113,37
5	95%	0,2	80	0,47623	0,51	95,25	<b>1,92</b>	<b>2,015</b>	0,484	96,85
6	105%	0,2	80	0,52555	0,51	105,11	<b>2,088</b>	<b>2,02</b>	0,525	105,06
7	95%	0,3	80	0,47623	0,51	95,25	<b>1,475</b>	<b>1,55</b>	0,484	96,72
8	105%	0,3	80	0,52555	0,51	105,11	<b>1,734</b>	<b>1,558</b>	0,566	113,12
									Ecart type	7,5
									t °(0.05,7)	2.36

A présent on peut calculer les limites de confiance de l'effet moyen de chaque paramètre ou interaction.

**Tableau 37: Calcul des limites de confiances pour les effets des paramètres ou interactions**

Essai	Facteurs			Interactions			
	A (teneur en %)	B (Concentration en résorcinol (g/100ml))	C Température	AB	AC	BC	ABC
1	-97,25	-97,25	-97,25	97,25	97,25	97,25	-97,25
2	108,67	-108,67	-108,67	-108,67	-108,67	108,67	108,67
3	-96,76	96,76	-96,76	-96,76	-96,76	-96,76	96,76
4	113,37	113,37	-113,37	113,37	113,37	-113,37	-113,37
5	-96,85	-96,85	96,85	96,85	96,85	-96,85	96,85
6	105,06	-105,06	105,06	-105,06	-105,06	-105,06	-105,06
7	-96,72	96,72	96,72	-96,72	-96,72	96,72	-96,72
8	113,12	113,12	113,12	113,12	113,12	113,12	113,12
<b>Somme</b>	52,64	12,14	-4,3	13,37	13,37	3,73	3
<b>Effet</b>	6,58	1,52	-0,54	1,67	1,67	0,47	0,38
<b>Limite inférieure</b>	<b>0,31</b>	<b>-4,75</b>	<b>-6,81</b>	<b>-4,6</b>	<b>-4,6</b>	<b>-5,81</b>	<b>-5,9</b>
<b>Limite supérieure</b>	<b>12,85</b>	<b>7,79</b>	<b>5,73</b>	<b>7,94</b>	<b>7,94</b>	<b>6,74</b>	<b>6,65</b>
<b>Facteur signification (S) ou Non significatif (NS)</b>	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS

**Discussion :**

- Pour le paramètre A : l'intervalle de confiance calculé ne contient pas le zéro, cela implique que l'effet du paramètre A est significatif, on conclut à l'influence des variations du paramètre A (teneur en PA) sur le résultat final.
- Pour les paramètres B et C : l'intervalle de confiance contient le zéro, donc les effets des paramètres B et C sont non significatifs, on conclut à l'insensibilité de la procédure d'analyse aux variations des paramètres B et C (concentration en résorcinol et température de chauffage respectivement)
- Pour les interactions : tous les effets des interactions sont non significatifs, on peut dire que l'effet de chaque paramètre ne dépend pas du niveau auquel on expérimente avec l'un ou les autres paramètres.

**CONCLUSION**

Afin d'évaluer la conformité d'un médicament, les industriels du médicament procèdent à des opérations de contrôle qualité au cours de tout le processus de production, tel que la détermination de la teneur en principe actif.

En industrie pharmaceutique, toute méthode appliquée au contrôle qualité des médicaments doit être validée conformément aux normes internationales, celle-ci fait partie d'une part du système d'assurance qualité qui a pour principale mission de veiller sur la qualité du médicament, d'autre part il est une exigence réglementaire.

La finalité de ce travail a été de proposer une méthode de dosage spectrophotométrique dans l'UV du lactulose dans un sirop secondairement à la méthode de référence qui est la chromatographie liquide à haute performance à détection réfractométrique.

Au cours de ce travail, Nous avons opté pour deux étapes clés :

- Une mise au point d'une méthode de dosage par spectrophotométrie dans l'UV avec optimisation des conditions opératoires.
- Validation de la méthode selon le guide de validation de la SFSTP 1992 en ayant recours à l'outil statistique.

La validation analytique portait sur les critères : Spécificité, Linéarité, exactitude, fidélité et robustesse. Ceux-ci ont été étudiés et attestent que la méthode a les performances nécessaires pour répondre à son usage en routine pour le dosage du lactulose.

- Le critère spécificité a démontré l'absence d'interférence des excipients avec le signal du lactulose.
- La méthode est jugée linéaire dans l'intervalle de concentration de 300 µg/ml à 700 µg/ml dans les deux gammes standard et forme reconstituée, les coefficients de corrélation sont très satisfaisants et l'étude statistique est concluante.
- L'exactitude de la méthode est démontrée avec un intervalle de confiance de 98.88 à 101.60%.
- La méthode est jugée fidèle avec un coefficient de variation de répétabilité de 0.70 % et de fidélité intermédiaire de 0.79 %, les deux sont inférieurs à la limite préétablie à savoir 2.0%.
- La robustesse de la méthode a été étudiée pour des variations délibérées de quelques conditions expérimentales, les deux estimées très influents sur le résultat analytique durant

l'étape de mise au point est la température de chauffage ainsi que la concentration en résorcinol. La méthode est robuste pour le changement de 10°C au tour de valeur cible 70°C et de 0.05% sur la concentration théorique en résorcinol.

Ainsi à l'issue de ce travail nous proposons un protocole de dosage de lactulose dans le produit fini sirop, la méthode décrite dans ce manuscrit peut être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité.

Cependant il nous semble qu'il est très important d'attirer l'attention que compte tenu de la présence des autres sucres à l'exemple du fructose dans la matière première de lactulose, ces sucres sont généralement d'une teneur très variable et qui peuvent être à l'origine d'interférences lorsqu'ils sont présents en forte proportion. Nous recommandons d'ajouter dans la procédure d'analyse, la préparation d'une solution de au même niveau de concentration que celle du standard à partir de la même matière première utilisée dans la formulation du produit fini contrôlé. Cette solution sera considérée comme un standard de contrôle.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] ANDREXS. GR. 1984. distinctif pasteurisé, UHT et laits stérilisés par leur contenu lactulose. *J. Soc. Dairy Technol*, 37, 92-95.
- [2] ROSE. C. F. 2012. Ammonia-Lowering Strategies for the Treatment of Hepatic Encephalopathy. *Clin Pharmacol Ther*, 92:321-331.
- [3] DENDENE.K., GUIHARD. L., NICOLAS. S & BARIOU. B. 1994. Kinetics of lactose isomerisation to lactulose in an alkaline medium. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 61(1), 37-42.
- [4] GUIDINI.M, PAPILLON.D, RAPHALEN.D et BARIOU.B.1974. Contribution à la valorisation du lactosérum. Synthèse du lactitol. *ann, biol, anim, bioch,biophys*, 14(3), 545-573.
- [5] ACQUISTUCCI .R, PANFILI G. MARCONI E. 1996. Application de l'hydrolyse de micro-ondes à furosine de résiliation en céréales et les produits laitiers. *J. Agric.Chem alimentaire*. 44, 3855-385.
- [6] DELANAYE P, SOUVIGNET M, DUBOURG L, THIBAUDIN L, MAILLARD N, KRZESINSKI JM, CAVALIER E, MARIAT C. 2011. Le dosage de l'inuline : mise au point. *Ann Biol Clin*; 63(3): 273-84
- [7] LAGOBO1 Z.C, MAMBO1.V, YAPO1.V.O, HOUENOU1 .V.P et DROCHIOIU.G. 2010. nouvelle méthode de détermination au spectrophotomètre du Dinitrophenol et dérivés dans les aliments et dans l'environnement. *RASPA Vol.8 N0S, 2010 Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*
- [8] OWEN T.2000.Principe fondamentaux de la spectroscopie UV-Visible une introduction. Allemagne. Agilent Technologies.
- [9] NAFTI Y.2008. Contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif: oxacilline sodique encapsulé en vue de déterminer les conditions de conservation. Ingénieur d'état : biologie : contrôle de la qualité et analyses :Université Ziane Achour de Djelfa, Algérie.
- [10]BERNARD A, CLEDE S, EMOND M, MONIN-SOYER H, QUERARD J.2012.Techniques expérimentales en chimie. Paris : DUNOD.
- [11] M. Le moniteur de l'internet. Toxicologie Sciences Mathématiques, Physiques et chimiques Tome 1. 2° ed. Rueil-Malmaison: Groupe liaisons.
- [12] Lafont R. Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie. Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules C-Techniques spectroscopiques. Consulté le 05/06/2014.  
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/spectro/C1.html>.

- [13] CAMUS A.2009. Mise en place du contrôle terminal des préparations d'anticancéreux injectables par spectrométrie UV-visible-IRTF, Multispec ® à l'Unité de Pharmacie Clinique et Cancérologique de l'Hôpital Bon Secours de Metz : Aspects analytiques et organisationnels. Doctorat : pharmacie : Université Henri Poincaré - Nancy I, France.
- [14] ROUESSAC F, ROUESSAC A.2004. Analyse chimique Méthodes et techniques instrumentales modernes.6<sup>e</sup> ed .Paris : DUNOD.
- [15] BAILLY Jerome .2004. Strategies de validation nettoyage en industrie chimique et pharmaceutique. Doc : Pharmacie : Université CLAUDE BERNARD - LYON I. Faculté de Pharmacie. Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques.
- [16] FEINBERG.M. 1996. La validation des méthodes d'analyse, une approche chimométrique de l'assurance qualité au laboratoire. Sciences de l'ingénieur. Paris : Masson
- [17] NICOLAS.O, FARENC.C, BRESSOLE.F. 2004. A strategy of validation of bioanalytical methods to support pharmacokinetic and toxicological studies ; annales de toxicologie analytique ,2 ; 244-251.
- [18] BOUKLOUZE1 .A, DIGUA2. K. 2006. Démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique. LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE - N°1 – 2006 Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. Faculté de Médecine et de Pharmacie – Rabat
- [19] THOMPSON, M., ELLISON, S.L.R., WOOD, R. 2002: Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem.*, 74, 835-855.
- [20] FEINBERG M. 1996. La validation des méthodes d'analyse. Paris : MASSON.
- [21] DUCAUZE C.J .2003. Méthodes d'analyse pour la recherche des fraudes alimentaires. In : Fraudes alimentaires – Approche réglementaire et méthodologie analytique, pp. 107-134, Tech & Doc Lavoisier, Paris.
- [22] ROUESSAC F, ROUESSAC A .2000. Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes. 5<sup>e</sup> édition, Paris : Dunod,
- [23] IDRIS I, MADJENE L. 2013. Dosage d'un sucre composé par UV Visible comparé à une méthode chromatographique. Faculté des Sciences. TIZI OUZOU.
- [24] CAPORAL-GAUTIER .J, NIVET .J.M, ALGRANTI P, HISTE.M, LALLIER M. (1992) .Guide de validation analytique d'une commission SFSTP. *S.T.P PHARMA PRATIQUES*, 2(4), 227-230.
- [25] VIAL.K ET MAPIHAN.A. 2002. Qualification, validation et test de conformité: outils indispensables pour la sécurité des analyses. *Jardy, Bioforum International* , Edition Française, 2, 18-21.

[26] JARDY.A, VIAL.J. 1999. L'apport des méthodes statistiques dans la maîtrise de la qualité des analyses. «*Dossier: Métrologie en chimie Analisis* », 27, 511-519.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Glucides

### 1. Classification :

Composés naturels, ils constituent l'infrastructure des végétaux. Ils jouent un rôle dans le stockage de l'énergie. Ils sont un élément fondamental de l'alimentation.

Ce sont des composés polyfonctionnels qui ont pour formule globale  $C_n(H_2O)_n$ , d'où le nom **d'hydrates de carbone**. Ils sont détaillés en plusieurs classes.

Les critères de classification font appel au nombre d'atomes de carbone de l'ose et à la nature du carboxyle.

- Le nombre d'atomes de carbone : 3C (triose) ; 6C (hexose)
- La nature du carbonyle : Aldéhyde → Aldose ; Cétone → Cétose
- La combinaison de ces 2 critères caractérise l'ose :
  - Aldopentose, Aldohexose, ...
  - Cétopentose, Cétohexose, ...

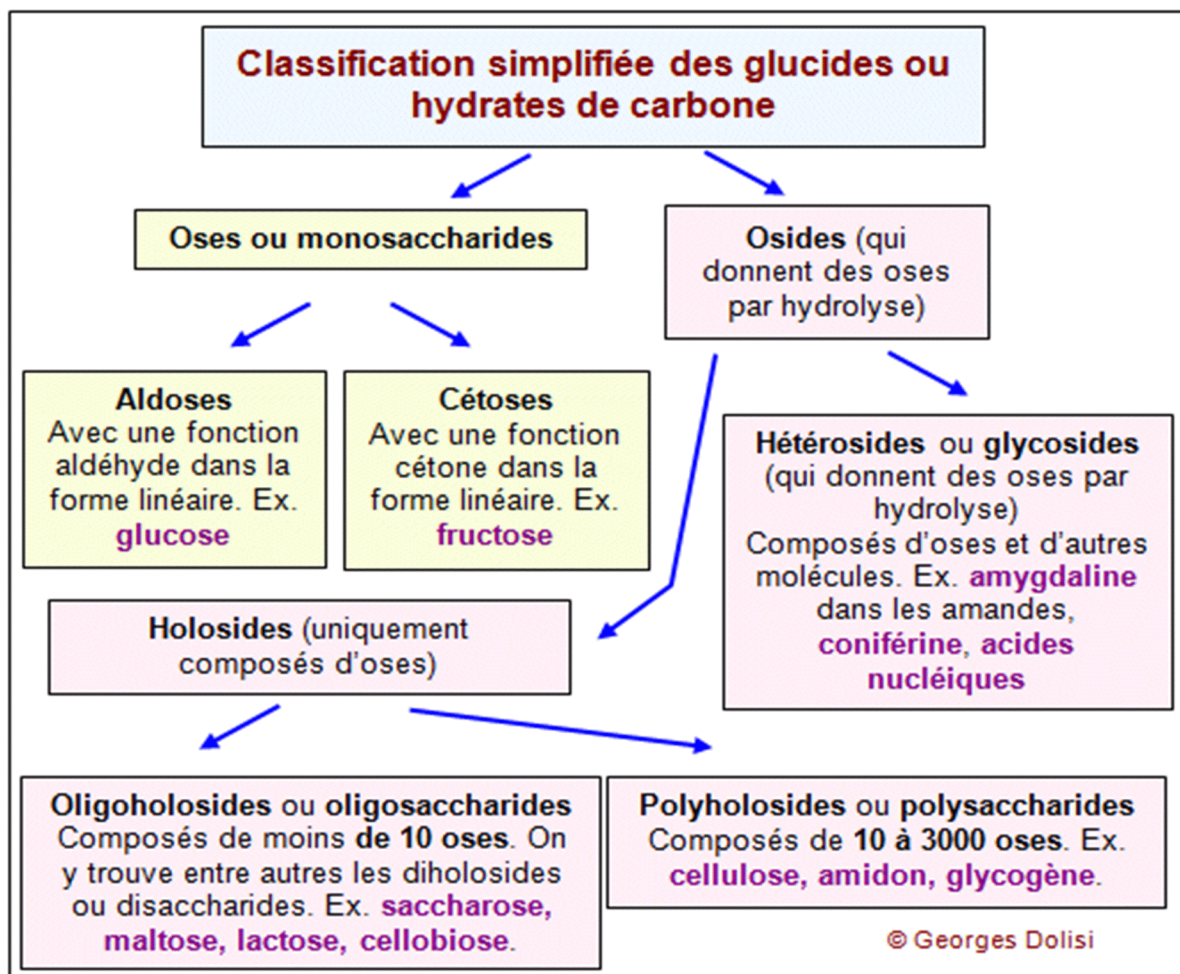


Figure I : Classification simplifiée des glucides ou hydrates de carbone.

## 2. Déshydratation en milieu acide :

C'est une propriété due à la fonction alcool, en milieu acide concentré et à chaud, les oses (à partir de 5 carbonnes) sont déshydratés en furfural ou dérivé du furfural (voir fig.)

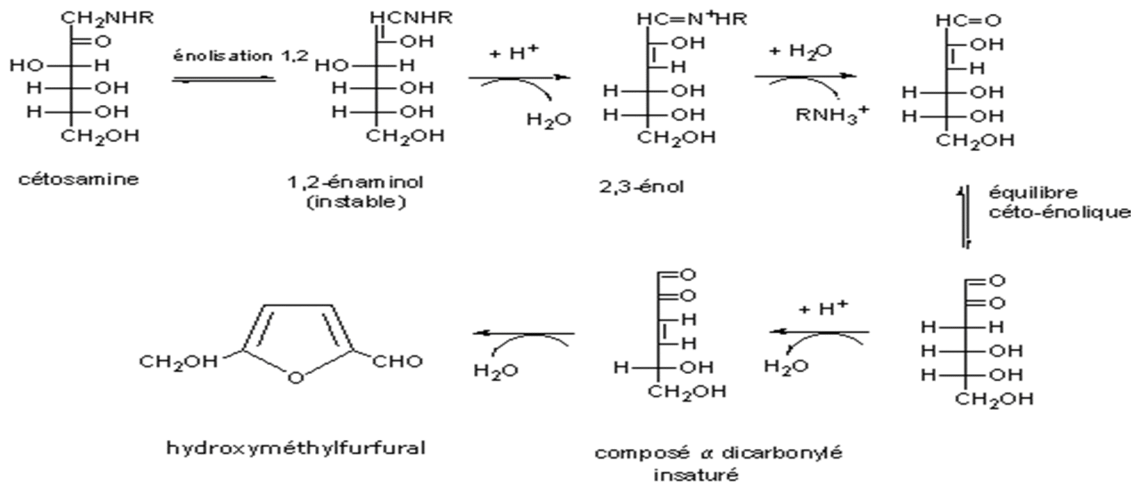


Figure 5 : Synthèse d'un furfural (déshydratation forte)

### Figure II: Synthèse d'un furfural (déshydratation forte)

Ces furfurals ou dérivés se condensent avec des phénols pour donner des produits colorés utilisés pour la caractérisation et le dosage colorimétrique des oses, on distingue :

- **Réaction de Molish :** Tous les oses à partir de 5 carbonnes en milieu acide sulfurique et à chaud sont furfuralisés, le furfural formé se condense avec le  $\alpha$ -naphthol pour donner un composé de couleur violette.

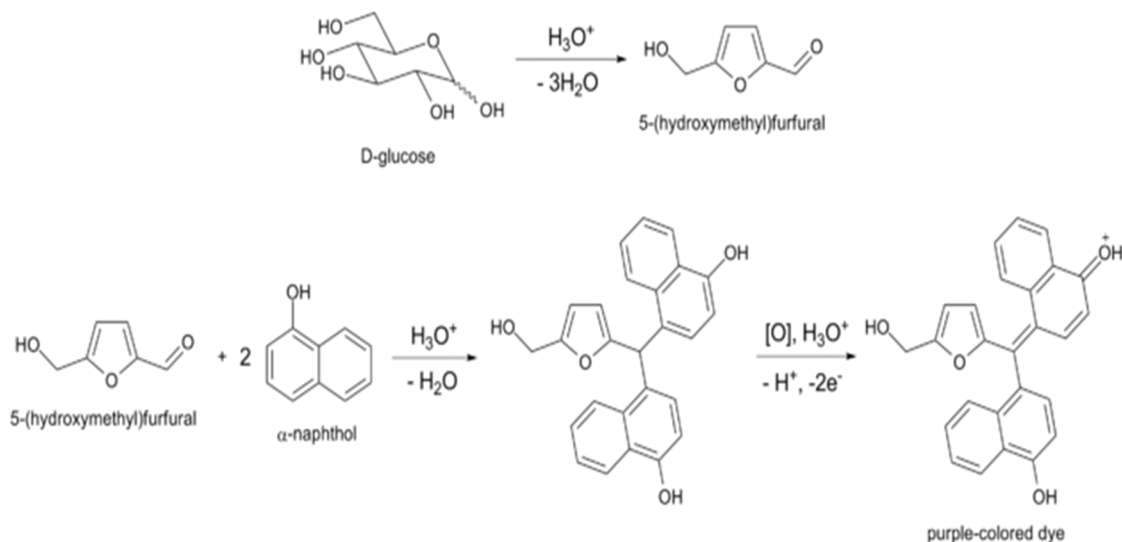
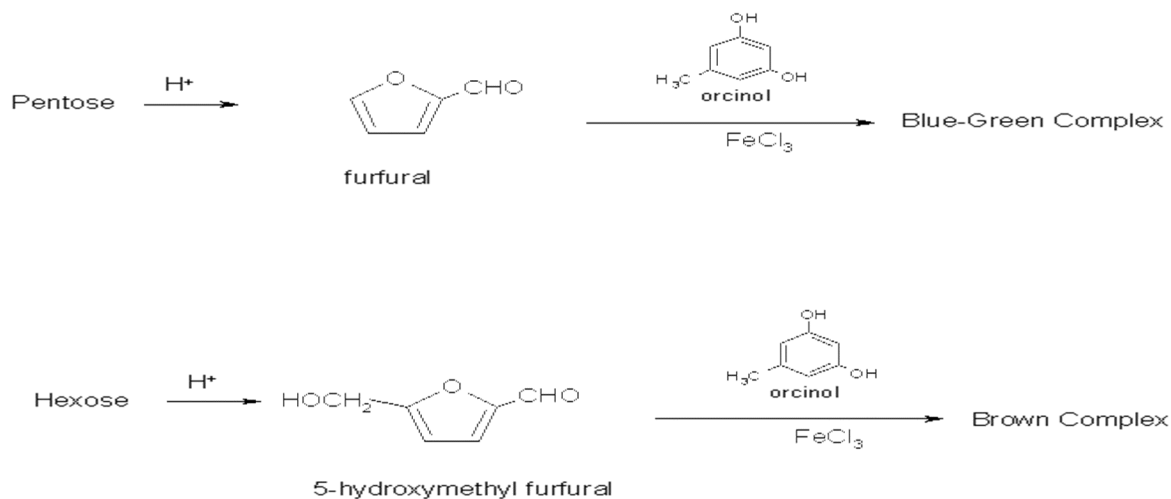


Figure III: Réaction de Molish

- **Réaction de Bial :** Pentoses dans le milieu acide et à chaud en présence de l'Orcinol donne une coloration verte, tandis que les hexoses donnent un composé de couleur brune.

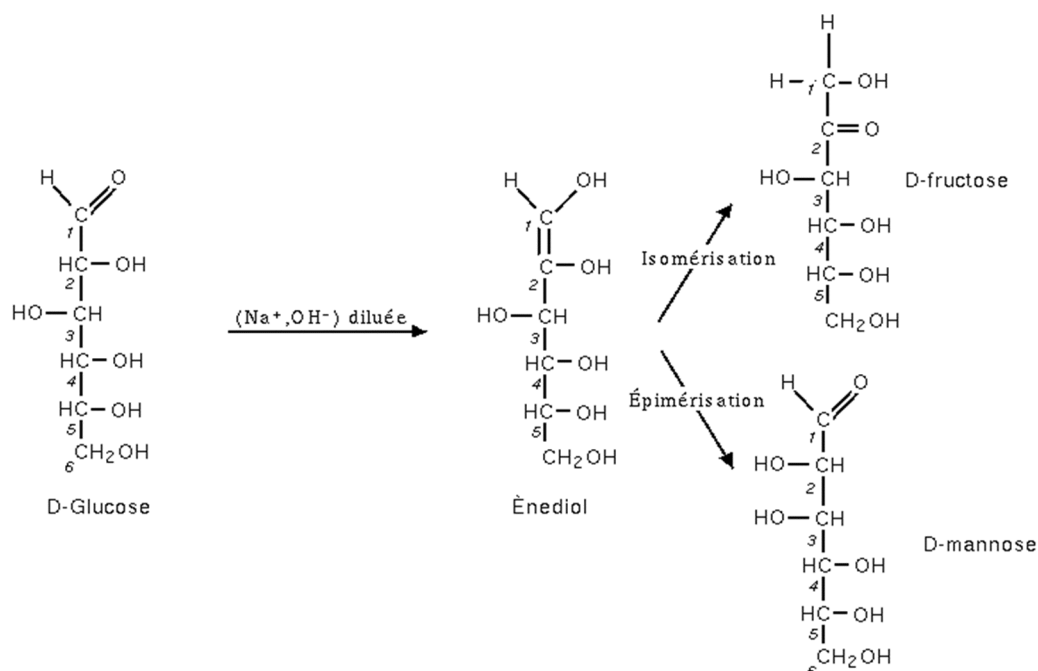


**Figure IV: Réaction de Bial**

- Réaction de Séliwanoff** : Tout les Cétoses réagissent avec le résorcinol dans un milieu acide (HCl) et à chaud et donnent ainsi une coloration rouge. (largement documentée dans le manuscrit).

### 3. Isomérisation en milieu alcalin

C'est une propriété due à un groupement alcool et un groupement carbonyle voisins.



**Figure V: Isomérisation en milieu alcalin.**



- **Les laxatifs de lest :**

Les médicaments de cette famille sont des substances naturelles qui ont la propriété de n'être ni digérées, ni absorbées lorsque l'on les ingère et ont un mode d'action purement mécanique. Elles gonflent par absorption de l'eau de notre corps, augmentent d'autant le volume des selles et en facilitent du coup leur élimination naturelle. Ces médicaments sont quelquefois responsables d'inconfort (de ballonnements), en début de traitement seulement.

- **Les laxatifs osmotiques :**

Ces médicaments attirent l'eau vers l'intestin et permettent d'augmenter le volume des selles pour une élimination naturelle facilitée. Ils sont également quelquefois responsables d'inconfort (*ballonnements*), en début de traitement seulement.

- **Les laxatifs lubrifiants :**

Ces médicaments contiennent une huile inerte (*huile de paraffine*) qui n'est pas du tout absorbée par notre organisme et qui n'a aucune valeur calorique. Cette huile, en se retrouvant intacte au niveau de l'intestin, permet de lubrifier les selles et d'en faciliter leur élimination.

- **Les laxatifs stimulants :**

Ces médicaments augmentent les sécrétions et accélèrent la motricité de l'intestin (*accélèrent et augmentent les contractions naturelles de l'intestin*). Ils provoquent quelquefois des coliques. Ils sont à utiliser ponctuellement ; en cas de prise régulière, prenez conseil auprès de pharmacien afin de vous assurer de la compatibilité de ces laxatifs avec vos autres médicaments éventuels.

- **Les laxatifs par voie rectale :**

Sous forme de suppositoires (*ex: suppositoires à la glycérine*) ou alors de lavement, ils peuvent être utiles en cas de constipation terminale. Ils servent alors à déclencher le réflexe de défécation sans remédier à la cause de la constipation. Ces formes peuvent provoquer une irritation anale et pour cette raison ne sont pas à utiliser couramment.

## Annexe 4 : Résorcinol :

**Tableau I: Caractéristiques du résorcinol**

	<b>Propriétés</b>
<b>Nom</b>	Résorcine/Résorcinol
<b>Autres noms :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,3-BENZENEDIOL</li> <li>• 1,3-DIHYDROXYBENZENE</li> <li>• META-DIHYDROXYBENZENE</li> </ul>
<b>Formule moléculaire brute</b>	$C_6H_6O_2$
<b>Utilisation :</b>	Fabrication de produits pharmaceutiques, fabrication de résines
<b>Apparence</b>	Solide poudreux ou en cristaux, blanc à odeur caractéristique.
<b>État physique :</b>	Solide
<b>Masse moléculaire :</b>	110,11 g/mol
<b>Densité :</b>	1,272 g/ml à 20 °C
<b>Solubilité dans l'eau :</b>	1 111,00 g/l à 20 °C
<b>Densité de vapeur (air=1) :</b>	3,80
<b>Point de fusion :</b>	110,7 °C
<b>Point d'ébullition</b>	281 °C
<b>Inflammabilité</b>	Peut s'enflammer s'il est chauffé fortement et en présence d'une source d'ignition
<b>Point d'éclair :</b>	127 °C
<b>T° d'auto-ignition</b>	585 °C
<b>Techniques et moyens d'extinction</b>	Eau, dioxyde de carbone, mousse.
<b>Stabilité</b>	Ce produit est instable dans les conditions suivantes: Il change de couleur et devient rose à la lumière et l'air. Se volatilise à une température plus basse que son point d'ébullition. Hygroscopique.
<b>Incompatibilité</b>	Ce produit est incompatible avec ces substances: Les agents oxydants forts, certains catalyseurs tels que le fer
<b>Manipulation</b>	Ventiler adéquatement sinon porter un appareil respiratoire approprié. Ne pas manger et ne pas boire pendant l'utilisation.
<b>Entreposage</b>	Conserver dans un endroit sec et sombre. Conserver à l'abri des matières oxydantes.
<b>Propriétés toxicologiques</b>	Ce produit est absorbé par les voies respiratoires, la peau et les voies digestives. Ce produit peut irriter la peau et corrosif pour les yeux. Suite au contact répété ou prolongé, ce produit cause l'irritation de la peau et des voies respiratoires.

## **Annexes 5 : Spectrophotométrie UV/Visible.**

### **1. Appareillage :**

#### **1.1. Différents composants :**

Un spectrophotomètre est un instrument servant à mesurer la transmission ou l'absorbance d'un échantillon. Les principaux composants d'un spectrophotomètre sont :

##### **1.1.1 Sources lumineuses :**

Le rôle de la source est de fournir la radiation lumineuse. Deux sources sont utilisées couramment dans les spectrophotomètres UV-visible, l'une pour la partie du proche UV et l'autre pour la partie s'étendant vers le visible.

- Dans la région de l'UV (190 à 400 nm), la source est une lampe à décharge au deutérium.
- Une lampe à filament de tungstène est utilisée pour la région allant de 350 à 800 nm.

##### **1.1.2. Unités de dispersions (monochromateur) :**

Les unités de dispersion font que différentes longueurs d'onde de lumière sont dispersées sous des angles différents. Combinées à une fente de sortie appropriée, ces unités permettent de sélectionner une longueur d'onde particulière (ou, plus précisément, une bande d'onde étroite) de lumière provenant d'une source continue. Deux types d'unités de dispersion, prismes et réseaux holographiques, sont couramment utilisés dans les spectrophotomètres UV-visible.

##### **1.1.3. Détecteurs :**

Un détecteur convertit un signal lumineux en un signal électrique. (Fondamentale)

Les détecteurs couramment employés sont des tubes photomultiplicateurs et, plus récemment, des photodiodes.

La lecture de l'absorbance d'un échantillon est déterminée en mesurant l'intensité de la lumière atteignant le détecteur sans échantillon (c'est le « blanc ») et l'intensité de la lumière atteignant le détecteur après avoir traversé l'échantillon.

### **1.2. Configurations de spectrophotomètres UV-visible**

#### **1.2.1. Spectrophotomètres mono-faisceau**

##### **❖ Spectrophotomètres à optique mono-faisceau, de type monocanal**

La mesure de l'absorbance (ou transmittance) avec ce type d'appareils exige de comparer à la même longueur d'onde le signal de la source avant et après traversée de la solution échantillon. On place donc successivement sur le trajet optique un témoin correspondant au solvant seul ou une solution contenant les réactifs du dosage (mais

sans le composé à doser, c'est le *blanc analytique*), puis la solution préparée à partir de l'échantillon de concentration inconnue.

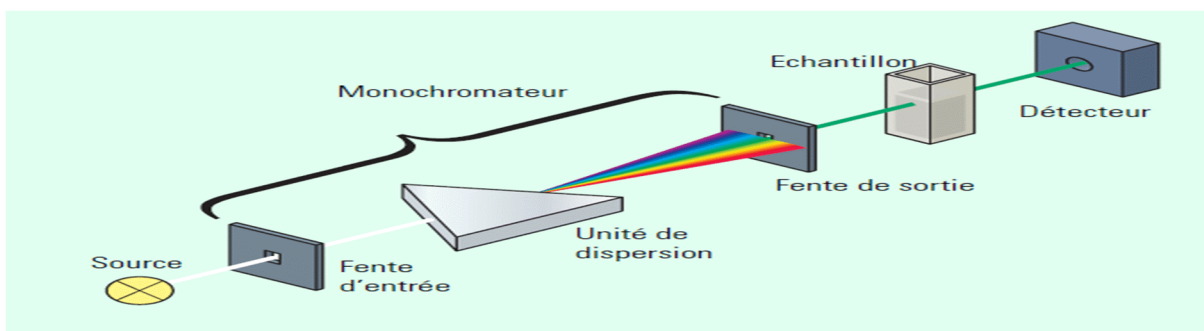


Figure : spectrophotomètre mono-faisceau à optique directe

#### ❖ Spectrophotomètres à optique inversée, de type multicanaux

Cette catégorie d'appareils comporte simplement un réseau situé après le compartiment échantillon pour diffracter les radiations transmises. Ils fonctionnent suivant le principe des spectrographes.

#### 1.2.2. Spectrophotomètre bi-faisceau

Outre les spectrophotomètres mono-faisceau, il existe des spectrophotomètres UV-visible bi-faisceaux. Dans l'appareil, deux logements côte à côte peuvent accueillir la cuve de « blanc » pour l'un et la cuve de solution à analyser pour l'autre. Le signal reçu par le photodétecteur est en permanence corrigé du signal du « blanc ». Ceci permet une mesure plus rapide et plus précise de l'absorbance. (voir figure)

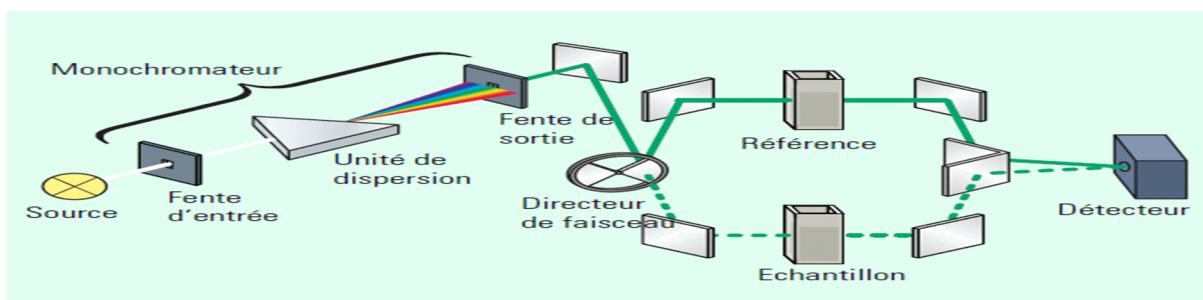


Figure : Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-visible bi-faisceau.

### Annexes 6: Critères de validation analytique

#### ➤ Spécificité :

Capacité d'une méthode analytique à mesurer un analyte particulier sans que cette mesure ne soit faussée par d'autres composants de l'échantillon. La spécificité mesure le degré

d'interférences entre un principe actif et d'autres composants présents dans l'échantillon (excipients, produits de dégradation...)

➤ **Linéarité :**

La linéarité est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle à fournir une réponse instrumentale ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour laboratoire

➤ **Fidélité :**

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de réplicabilité, de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

**-Réplicabilité :**

La réplicabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même appareil, même jour.

**-Répétabilité :**

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour.

**-Reproductibilité :**

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour.

**-Exactitude :**

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention

➤ **Robustesse :**

La robustesse est la qualité d'une méthode capable de donner des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables dans des conditions diverses. Elle permet d'évaluer dans quelle mesure les résultats obtenus sur des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser, subissent l'influence des changements

apportés aux conditions opérationnelles ou environnementales, dans la limite des spécifications établies pour la méthode.

Selon ICH, la robustesse fait partie de la validation et est réalisée en complément des expériences de validation.

# GLOSSAIRE

- **Coefficient d'extinction moléculaire ( $\epsilon$ ) :**

Le coefficient d'absorption molaire ( $\epsilon$ ) est le rapport entre l'absorption et la concentration d'une entité chimique absorbante dans ce milieu (exprimé en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

- **Encéphalopathie hépatique**

Est un syndrome neuropsychiatrique complexe caractérisé par des modifications de l'état de conscience et du comportement, des changements de personnalité, des signes neurologiques et des changements à l'électroencéphalogramme (EEG). Il peut être aigu et réversible (insuffisance hépatique aiguë, facteurs précipitant en situation de dommage hépatique chronique) ou chronique et irréversible.

- **Endotoxines** (du grec : endon et toxicon, intérieur et poison)

Sont des toxines situées dans la membrane externe de certaines bactéries Gram négatif, de nature lipopolysaccharidique et thermostables. Elles ne sont libérées que lors de la lyse de ces bactéries, et peuvent occasionner une réponse inflammatoire générale démesurée, ou syndrome de réponse inflammatoire systémique, pouvant entraîner la mort. Si l'endotoxine parvient à atteindre la circulation sanguine, elle peut entraîner un choc septique.

- **Fréquence :**

La fréquence ( $\nu$ ) exprime le nombre de cycles par seconde de l'onde qui se répète. L'unité de fréquence du Système International est le **Hertz (Hz)**, 1 Hz représente un cycle (ou onde) par seconde. La fréquence est inversement proportionnelle à la **longueur d'onde** (la distance qui sépare deux pics). La fréquence est égale à la vitesse divisée par la longueur d'onde :  $\nu = c / \lambda$

- **Ictère**

Est synonyme de jaunisse. Il correspond à une coloration jaune de la peau et des muqueuses due à l'accumulation dans les tissus de bilirubine. La première manifestation visible d'un ictère apparaît au niveau des conjonctives oculaires. La bilirubine est un pigment jaune ocre excrété dans la bile.

- **Isomère**

Qualifie des molécules ayant la même formule structurale brute mais des structures moléculaires développées différentes. Il existe différents types d'isomères : isomères de fonction, isomères de position, isomères stériques et isomères optiques.

- **Longueur d'onde :**

La longueur d'onde ( $\lambda$ ) est la distance sur laquelle une répétitivité de l'ondulation (ou oscillation complète) se produit (c'est la distance parcourue par l'onde pendant une période).

$$\lambda = c / \nu = cT$$

Où  $\lambda$  représente la longueur d'onde,  $c$  la vitesse de l'onde en m/s,  $T$  la période en s et  $\nu$  la fréquence en Hz.

- **Péristaltisme**

On appelle **péristaltisme** l'ensemble des contractions musculaires « mouvements péristaltiques » permettant la progression d'un contenu à l'intérieur d'un organe creux.

- **Pharmacopée**

La Pharmacopée est un ouvrage réglementaire destiné :

- Aux professionnels de santé utilisateurs de matières premières ou en charge des préparations pharmaceutiques
- Aux laboratoires (publics ou privés) chargés des contrôles de qualité et services d'évaluation des médicaments

Elle est constituée de différentes monographies. Chaque monographie est un ensemble de spécifications qui définissent les caractéristiques qualitatives et quantitatives d'une substance en vue d'assurer une qualité optimale compatible avec les exigences de santé publique.

Les normes de ce référentiel scientifique font autorité pour toute substance ou monographie figurant dans la Pharmacopée. La Pharmacopée est régulièrement mise à jour.

- **Prébiotiques**

Sont généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides à courte chaîne constitués approximativement de deux à vingt unités de sucre. Ils échappent à la digestion dans l'intestin grêle et sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries intestinales.

- **Protéolytique**

Destruction des protéines en leurs éléments constitutifs.

- **Spectre électromagnétique** : Le spectre électromagnétique représente la répartition des ondes électromagnétiques en fonction de leur longueur d'onde, de leur fréquence ou bien encore de leur énergie.

- **Syndrome hépatorénal**

Correspond à une insuffisance rénale aiguë fonctionnelle survenant le plus souvent dans l'évolution d'une cirrhose hépatique sévère.

- **Test de Cochran**

A pour objet la vérification de l'homogénéité des variances concernant plusieurs populations.

- **Test de fisher**

Permet de savoir si leurs variances peuvent être considérées comme identiques, pour un niveau de confiance donné pour deux échantillons indépendants et distribués normalement.

- **Test de Student :**

Ce test permet de comparer les mesures d'une variable quantitative effectuées sur deux groupes de sujets indépendants définis par les modalités de la variable qualitative.

- **Translocation bactérienne intestinale :**

Passage de bactéries résidentes viables de la lumière digestive dans des tissus au-delà du tube digestif.