

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique



Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie physico-chimique



Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biochimie

Option : Pharmacologie moléculaire

Thème

Validation de méthode de dosage pharmaceutique

Application au dosage des parabènes dans Maxilase[®] et au dosage du saccharose dans Rhinathiol[®]

Réalisé par:

M^{elle} BEKKA Salima
M^{elle} TIFAOUI Kahina

Membre de jury:

Promoteur : M^r HARFI .T
Co-promoteur : M^{me} Sedkaoui. M
Président : M^r GHIDOUCHE .A
Examineur: M^r HAMOUM .M
Examineur: M^{me} SADAOUI .K

Grade :

MAB
RCQ
MCB
MAA
MAB

Année Universitaire 2013/2014

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant et miséricordieux pour nous avoir donné le courage et la volonté et la patience durant toutes ces années d'études.

Nous remercions M^{me} Sedkaoui pour sa disponibilité et ses recommandations tout au long de notre stage

Nous voudrions présenter nos remerciements les plus profonds à notre encadreur M^r Harfi

Nous voudrions également lui témoigner notre gratitude pour sa patience et son soutien qui nous a été précieux afin de mener notre travail à bon port.

Merci

Nous voudrions ainsi remercier M^r Ghidouche, M^r Hamoum et M^{me} Sadaoui pour avoir accepté d'évaluer notre travail

Nos remercions ainsi le personnel de Sanofi qui nous a réservé un accueil chaleureux et qui nous a apporté toute l'assistance nécessaire durant notre stage, en particulier

Hayet, Nadia, Sabrina, Hafid, Rabia, Djazia et surtout Karim et Belaid

Dédicaces

A mes chers parents

A mes sœurs

A mon frère

A mes très chères copines

A toi Kahina ainsi qu'à toute ta famille

Et à tout mes Amis

Salima

Dédicaces

A mes très chers parents

A mes sœurs

A mes frères

A toi mon âme

A ma très chère copine et sœur Samira

A toi Salima ainsi qu'à toute ta famille

Et à tout mes Amis

Kahina

SOMMAIRE

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

Synthèse bibliographique

I. Définition de la Validation	2
II. La validation dans le domaine pharmaceutique.....	2
III. Critères de validation.....	3
IV. Les types de validation.....	6
V. Les modalités de maîtrise des risques	7
VI. Cycle de vie d'une méthode analytique.....	8

Chromatographie liquide a haute performance (HPLC)

1. Définition.....	9
2. Principe.....	9
3. Appareillage.....	9

Technique de polarimétrie

1. Définition.....	10
2. Activité optique.....	10
3. Pouvoir rotatoire.....	11
4. Principe.....	11

Partie expérimental

Présentation de l'organisme d'accueil « Sanofi ».....	12
---	----

Matériels et méthodes

A : Etude pratique de validation de dosage des parabènes	13
I. Matériels et méthodes.....	14
1. Réactifs analytiques.....	14
2. Principe actif et excipients (formule du médicament).....	14
3. Appareillage.....	14
II. Techniques.....	15
1. Dosages des POB par HPLC.....	15
III. Analyse statistique ou validation proprement dite.....	20
1. Test de linéarité.....	20
2. Test de Fidélité.....	21

3. L'exactitude.....	22
B : Etude pratique de validation de dosage de saccharose.....	23
I. Matériels et méthodes.....	23
1. Excipients.....	23
2. Produit fini.....	23
3. Appareillage.....	23
II. Mode opératoire.....	24
1. Préparation des solutions.....	24
2. Test de spécificité.....	24
3. Test de linéarité.....	24
4. Test de répétabilité.....	25
5. Test de stabilité.....	25
III. Démarche statistique.....	26
1. Test de spécificité.....	26
2. Test de linéarité.....	26
3. Test de Répétabilité.....	26
4. Test de stabilité.....	26
Résultats et discussion	
A. Les résultats de dosage des parabènes par HPLC.....	27
I. Résultats de dosage par HPLC.....	27
1. Résultats du test de linéarité.....	27
2. Résultats du test de fidélité.....	29
II. Analyse statistique.....	30
1. Résultats d'analyse de linéarité.....	30
2. Résultats d'analyse de la fidélité.....	38
3. Résultats d'analyse de l'exactitude.....	40
B. Les résultats de dosage de saccharose par polarimètre.....	43
1. Résultats du test de linéarité.....	43
2. Résultats de test de répétabilité.....	44
3. Résultats de test de stabilité.....	45
4. Résultats de test de spécificité.....	46
Conclusion.....	47
Références bibliographiques	
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes.

Figure 02 : Diagramme d'Ishikawa.

Figure 03 : Cycle de vie d'une méthode analytique.

Figure 04 : Le schéma de principe de fonctionnement de l'HPLC.

Figure 05 : Rotation de plan de polarisation par la substance active.

Figure 06 : Evolution de la surface en fonction de la concentration de POBM Na.

Figure 07 : Evolution de la surface en fonction de la concentration de la forme reconstituée.

Figure 08 : Evolution de la surface en fonction de la concentration de POBP Na.

Figure 09 : Evolution de la surface en fonction de la concentration de la forme reconstituée.

Figure 10 : Droite de régression de l'angle de rotation en fonction de la prise d'essai.

Figure 11 : Dosage de saccharose en fonction de temps.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Prises d'essai de paraoxybenzoate de méthyl sodique et paraoxybenzoate de propyl sodique.

Tableau 2: Prises d'essai de paraoxybenzoate de méthyl sodique et paraoxybenzoates de propyl sodique.

Tableau 3 : Prises d'essais pour chaque concentration du produit fini.

Tableau 4 : Résultats de test de linéarité paraoxybenzoate de méthyl sodique seul / paraoxybenzoate de méthyl sodique et excipients

Tableau 5: Résultats de test de linéarité paraoxybenzoate de propyl sodique seul / paraoxybenzoate de propyl sodique et excipients

Tableau 6 : Dosage de paraoxybenzoate de méthyl sodique

Tableau 7 : Dosage de paraoxybenzoate de propyl sodique

Tableau 8: Paramètres de l'équation de linéarité de paraoxybenzoate de méthyl sodique

Tableau 9 : Paramètres de l'équation de linéarité de la forme reconstituée.

Tableau 10 : Paramètres de l'équation de linéarité de paraoxybenzoate de propyl sodique

Tableau 11: Paramètres de l'équation de linéarité de la forme reconstituée.

Tableau 12: Test de Student pour paraoxybenzoate de méthyl sodique

Tableau 13: Test de Student pour la forme reconstituée.

Tableau 14 : Test de Student pour paraoxybenzoate de propyl sodique

Tableau 15: Test de Student pour la forme reconstituée.

Tableau 16: Test d'homogénéité des variances pour paraoxybenzoate de méthyl sodique seul

Tableau 17 : Test d'homogénéité des variances pour sa forme reconstituée.

Tableau 18 : Test d'homogénéité des variances pour paraoxybenzoate de propyl sodique

Tableau 19: Test d'homogénéité des variances pour la forme reconstituée.

Tableau 20: Test de Fisher pour paraoxybenzoate de méthyl sodique seul

Tableau 21: Test de Fisher pour sa forme reconstituée.

Tableau 22 : Test de Fisher pour paraoxybenzoate de propyl sodique seul

Tableau 23 : Test de Fisher pour la forme reconstituée.

Tableau 24 : Test de Fisher pour paraoxybenzoate de méthyl sodique seul

Tableau 25 : Test de Fisher pour la forme reconstituée.

Tableau 26 : Test de Fisher pour paraoxybenzoate de propyl sodique seul

Tableau 27 : Test de Fisher pour la forme reconstituée.

Tableau 28: Résultats de fidélité du dosage de paraoxybenzoate de méthyl sodique

Tableau 29: Résultats de la fidélité du dosage du paraoxybenzoate de propyl sodique

Tableau 30: Résultats de l'exactitude paraoxybenzoate de méthyl sodique

Tableau 31: Résultats d'exactitude de paraoxybenzoate de propyl sodique

Tableau 32: Résultats de test de linéarité.

Tableau 33: Résultats de l'étude de la droite de régression de saccharose.

Tableau 34: Résultats de test de la répétabilité de dosage du saccharose.

Tableau 35: Résultats de test de stabilité du dosage de du saccharose.

Tableau 36: Résultats de recouvrement a $t=2h$ et $t=4h$.

LISTE DES ABREVIATIONS

a : pente

b : Ordonné à l'origine

BPL : bonnes pratiques de laboratoire

BPF : bonnes pratiques de fabrication

C : test de Cochran

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CV : Coefficient de variation

DDL : Degré de liberté

F : Test de Fisher

HPLC : Chromatographie liquide a haute performance

ISO : International Standard Organisation

N : nombre totale d'essai

n : nombre d'essai

k: nombre répétition par essai

PE : Perturbateur endocrinien

POBM : para-hydroxybenzoïque de méthyl sodique

POBP : para-hydroxybenzoïque de propyl sodique

R² : Coefficient de corrélation

S_b : l'écartype de l'ordonné à l'origine

SCE : Somme des carrés des écarts

t : Test de Student



Introduction

INTRODUCTION

Toute analyse, chimique, biologique ou autre, nécessite la mise au point de méthodes de séparation, d'identification et de dosage des analytes avec des résultats qui doivent être les mêmes pour tout opérateur procédant à l'analyse en question (**Feinberg, 1996**).

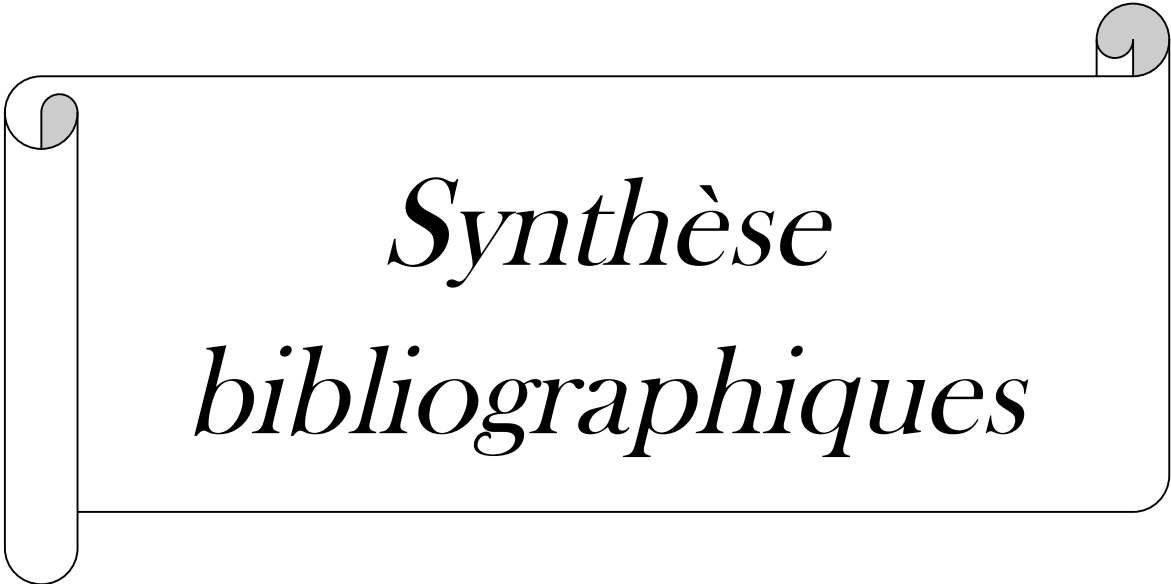
Tout laboratoire doit prendre les dispositions appropriées pour s'assurer qu'il est en mesure de fournir, et qu'il fournit, avec ses analyses des données du niveau de qualité requis. De telles dispositions comprennent l'utilisation de procédures de contrôle interne de qualité mais aussi l'utilisation de méthodes d'analyse conformes et validées (**Thompson, 2002**).

La validation est fondée sur une analyse statistique des méthodes analytiques, basée sur un certain nombre de critères, aboutissant à une *assurance* de donner des résultats fiables. Donc, elle a pour but de démontrer que les techniques correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées. Ceci fait clairement apparaître le lien très étroit qui existe entre la qualité d'une analyse et la validation de la méthode qui permet de la faire (**Guide, 2009**).

Parmi les analyses effectuées dans les laboratoires pharmaceutiques lors des contrôles de qualité : le dosage. Il permet de s'assurer, avec un maximum de garantie pour la santé publique, de la qualité du produit, dans un minimum de temps et au moindre coût. Il ne faut pas oublier que le produit fabriqué l'a été à partir de matières premières pharmaceutiques conformes, soit à une monographie officielle (Pharmacopée), soit à un cahier des charges analytiques très strict. Ainsi le contrôle des matières premières étant très complet, la démarche logique voudrait que le contrôle des produits finis soit le plus simple possible tout en garantissant la sécurité d'utilisation, ce qui nécessite des techniques adaptées et fiables (**ISO/IEC, 2005**).

Notre travail s'inscrit dans cette optique. Il a pour objectif de tester les principaux paramètres de validation des méthodes analytiques, développées au Laboratoire de contrôle de qualité des formes liquides (Sanofi - Algérie), pour le dosage des conservateurs parabènes (POBM Na et POBP Na dans Maxilase) et le dosage du saccharose dans le Rhinathiol. La méthode de dosage de POBM Na et POBP Na est la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) et celle du saccharose est la Polarimétrie. Cette validation est effectuée en interne et conformément aux procédures de dosage de ces deux formes pharmaceutique.

Pour ce faire, après une synthèse bibliographique, nous avons procédé à la validation des méthodes analytiques proposée dans cette étude sur les paramètres suivants : la linéarité, l'exactitude, la fidélité, la spécificité et la répétabilité.



*Synthèse
bibliographiques*

Généralités sur la validation des méthodes

I. Définition de la Validation :

La notion de validation implique qu'une technique d'usage généralisé doit être "prouvée", confirmée avant d'être reconnue.

La norme ISO/IEC 17025, définit la validation comme étant « *la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté donné sont remplies* ». Elle la définit aussi, comme l'ensemble des opérations effectuées en vue de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable, pour avoir confiance dans les résultats fournis pour l'usage prévu et comme une composante essentielle des mesures qu'un laboratoire devrait mettre en œuvre pour lui permettre de produire des données analytiques fiables.

La validation de méthode utilise un ensemble de tests qui vérifie les hypothèses de base de la méthode d'analyse et établit et documente les caractéristiques de performance de cette méthode. Ce faisant, elle démontre si une méthode est adaptée à son emploi analytique (**Willetts et al, 2005**). Les caractéristiques de performance habituelles des méthodes d'analyse sont : sélectivité, spécificité; linéarité; justesse; répétabilité, reproductibilité; capacité de détection; sensibilité et robustesse (**Désenfant, 2008**).

➤ *Objectif :*

- établir une procédure nécessaire pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé ;
- normaliser la méthode pour en faire une méthode alternative, ou de référence, en s'assurant que les résultats seront acceptés (**Eurachem, 1998**).

II. La validation dans le domaine pharmaceutique :

Le contrôle analytique d'un médicament et/ou de ses constituants est indispensable pour garantir que le médicament en question est conforme en quantité et qualité, et restera sûr et efficace pendant la durée de validité proposée, (stockage, distribution et durée d'utilisation) (**Feinberg, 2005**).

Les spécifications du médicament sont contrôlées par des protocoles validés ou *élaborés et validés* lors de sa mise au point. Ainsi, on aura l'assurance que les spécifications de qualité, et de quantité sont applicables non seulement à la préparation pharmaceutique qui a servi à établir les

caractéristiques pharmaco-toxicologiques des principes actifs et excipients, mais aussi aux formes galéniques mises sur le marché, cette étape est nécessaire et reste la seule base d'acceptabilité de tous les lots ultérieurs, du moins pour les principes (OMS, 1992).

Deux guides de l'ICH (International Conference on Harmonization) ont été dédiés à la validation analytique : Q2: «Analytical Validation»

• Q2A: «Text on Validation of Analytical Procedures (1994)»: Présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques

• Q2B: «Methodology (1996)» : Son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement (ICH, 2005).

En 2005 ces deux lignes directrices ont été regroupées en une seule : Q2_R.

Les types des procédures analytiques à valider décrites par l'ICH sont :

- Tests d'identification.
- Dosage quantitatif des impuretés.
- Vérification des teneurs limites des impuretés.
- Dosage de la partie active ou d'une ou de plusieurs autres composantes de la substance médicamenteuse ou du produit fini (ICH, 2005).

III. Critères de validation :

Les critères de validation sont définis par deux lignes directrices de l'ICH (Q2A 1994 et Q2B 1996) puis réunies en une seule, Q2_R1. Globalement ils se résument en une série de procédure physico-chimique analytique bien codifiée, validée par l'outil statistique (www.ich.org).

1. Linéarité :

C'est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle (dit domaine d'utilisation), à obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité ou à la concentration de substance à doser (www.adneurope.com), Le domaine d'utilisation est l'intervalle entre la concentration la plus faible et la concentration la plus élevée dont on a démontré qu'elles pouvaient être déterminées avec une précision, une exactitude et une linéarité. Ces caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé (Feinberg, 2008).

Les études sur la linéarité sont faites simultanément sur le principe actif et sur la forme pharmaceutique reconstituée (c'est-à-dire un mélange de tous les composés correspondants, quantitativement et qualitativement à la formule pharmaceutique à étudier, sauf la substance à analyser qui sera ajouté en quantité variable) permettant ainsi une comparaison directe des deux linéarités obtenues (**Procédure de Sanofi a**).

La fonction de calibration (ou d'étalonnage) est obtenue par régression linéaire, en utilisant la méthode des moindres carrés (on estime la linéarité, la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation de la droite d'étalonnage), en utilisant les tests suivants :

- le test de COCHRAN, utilisé pour démontrer l'homogénéité des variances ;
- le test de STUDENT, utilisé pour démontrer l'existence d'une ordonnée à l'origine ;
- le test de FISHER SNEDECOR est utilisé pour démontrer l'existence d'une pente significative (**OIV, 2005**).

2. Exactitude :

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur de concentration acceptée comme référence, valeur vraie, et la valeur déterminée par la procédure analytique. Ce test vérifie si la variance des recouvrements obtenue à un niveau de concentration (variance intra-groupe) est similaire à la variance des recouvrements moyens des différents niveaux de concentration (variance intergroupes).

Ceci est le prérequis pour que les données soient représentatives et permettent de réaliser le test de la valeur de recouvrement dans l'intervalle de confiance considéré (**Perrin, 2003**).

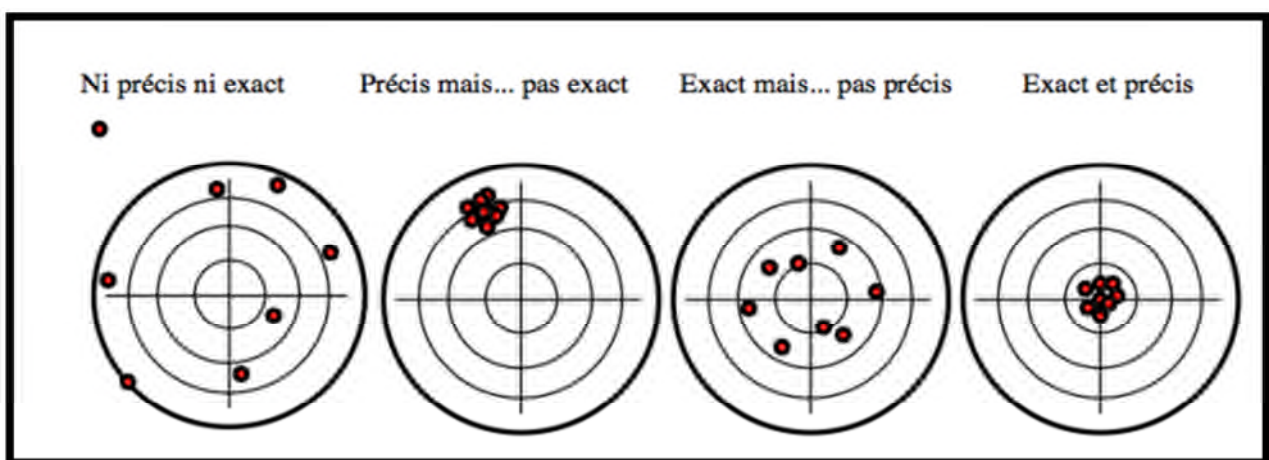


Figure 01 : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes (media4.obspm.fr)

L'exactitude est déterminée par :

- la comparaison des recouvrements individuels de la substance analysée dosée par la technique et celle introduite ;
- l'estimation du taux de recouvrement moyen et de son intervalle de confiance (**Eurachem, 1998**).

3. Justesse :

La justesse est définie comme l'aptitude de la procédure à considérer, comme vraie la valeur de la concentration d'un composé chimique, dans une matrice chimique plus au moins complexe.

La justesse se détermine par l'analyse d'un échantillon reconstitué, dont la teneur en substance à doser est parfaitement connue, ou a partir de références (**Procédure de Sanofi a**).

4. Fidélité :

La fidélité de la méthode exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de prises d'essai multiples d'un même échantillon, dans des conditions données. Elle s'exprime par la mesure de la répétabilité et de la reproductibilité (**Tahiri, 2002**).

La répétabilité est évaluée en faisant analyser un même échantillon, plusieurs fois par un même opérateur, dans un court laps de temps avec des conditions opératoire constantes (**Désenfant, 2008**).

La reproductibilité est vérifiée en faisant effectuer les manipulations par des opérateurs différents sur le même appareillage à des moments différents avec la même méthode sur un échantillon initial homogène.

Dans l'idéal la répétabilité est une validation en interne et la reproductibilité une validation en externe (**Ducellier, 2013**).

5. Spécificité :

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou plusieurs substances présentes dans l'échantillon.

Elle est dite sélective lorsqu'elle permet de détecter qualitativement la substance à analyser en présence de composants pouvant être présents dans l'échantillon (insensibilité à tout bruit de fond ou signal parasite). Les méthodes chromatographiques sont, en principes, sélectives (**Procédure de Sanofi a**).

6. Robustesse :

Permet d'étudier le transfert de la méthode vers d'autres laboratoires autre que celui où elle a été élaborée, les différences de matériel et de savoir-faire, d'un laboratoire à un autre, pouvant entraîner des variations des résultats obtenus, ces variations doivent être négligeables (Aubert et al, 2007).

7. Seuil de détection :

C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être détecté, mais non quantifiée comme une valeur exacte (Perruchet et al, 2000).

8. Seuil de quantification:

C'est le seuil de détection dosable, la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être dosé dans des conditions expérimentales décrites avec une fidélité définie et une exactitude définie (Perruchet et al, 2000).

IV. Les types de validation :

La validation "complète" d'une méthode d'analyse comprend l'examen des caractéristiques de la méthode dans le cadre d'une étude inter-laboratoire, des performances de celle-ci (également appelée étude collaborative ou externe). Des protocoles acceptés partout dans le monde ont été établis pour la validation "complète" d'une méthode d'analyse par un essai inter-laboratoires.

On peut effectuer une validation externe de:

- en participant à des circuits d'analyse inter-laboratoires ;
- en utilisant un matériau de référence certifié ou reconnu (Feinberg, 2004).

Une "validation interne de méthode" (effectuée par un seul laboratoire) peut être appropriée. La validation de méthode par un seul laboratoire est adéquate dans plusieurs situations, notamment dans les circonstances suivantes :

- pour s'assurer de la fiabilité de la méthode avant de s'engager dans l'exercice onéreux de l'essai inter-laboratoires formel;
- pour fournir la preuve de la fiabilité d'une méthode d'analyse lorsque des données d'essai inter-laboratoires ne sont pas disponibles ou lorsque l'organisation d'un essai inter-laboratoires formel n'est pas possible ;

- pour s'assurer que des méthodes validées "prêtes à l'emploi" sont correctement utilisées (Bouklouze, 2006).

V. Les modalités de maîtrise des risques :

La notion de "validation de méthode" découle directement du concept de Qualité (Assurance qualité ; gestion des risques, HACCP...etc.). Elle est en relation directe avec les concepts de bonnes pratiques de fabrication (BPF), spécialement élaborées pour l'industrie pharmaceutique et les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) (Ducellier, 2013).

Avant d'entamer la validation, il est indispensable de faire une étude des risques associés à l'analyse et définir les risques critiques, c'est-à-dire ceux qui peuvent perturber le résultat rendu au patient ou la prise en charge ultérieure de celui-ci. La méthodologie proposée est la méthode des 5M ou diagramme d'Ishikawa ou diagramme en arête de poisson (Feinberg, 2004).

Le diagramme d'ISHIKAWA, ou diagramme de cause à effet, est une représentation structurée de toutes les causes qui conduisent à une situation. Son intérêt est de permettre aux membres d'un groupe d'avoir une vision partagée et précise des causes possibles d'une situation. Le schéma (Figure 02) comprend les facteurs causaux identifiés et catégorisés selon la règle des " 5 M " (Bouklouze, 2006).

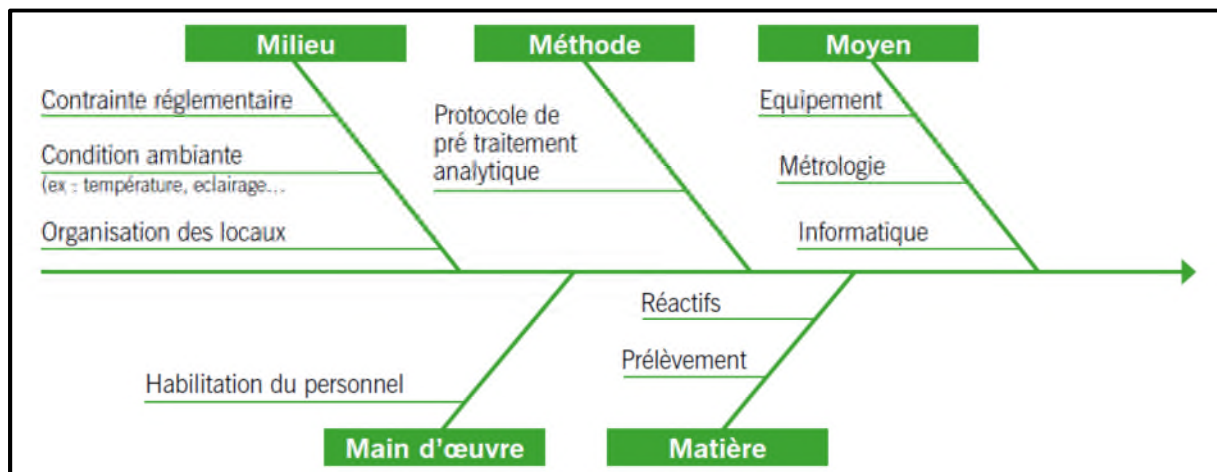


Figure 02 : Diagramme d'Ishikawa (media4.obspm.fr)

Le trait horizontal représente le processus analytique. A gauche, se situe l'élément d'entrée dans le processus (la demande d'examen) et à droite la sortie du processus (le résultat rendu). De part et d'autres de cette droite se situent des flèches représentant les éléments de mise en œuvre du processus que l'on peut répartir en 5 catégories (Matière, Moyen, Milieu, Main d'œuvre, Méthode) (Ducellier, 2013).

VI. Cycle de vie d'une méthode analytique :

Une méthode analytique est un moyen visant à exprimer concrètement un besoin bien exposé, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné. Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnés, les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Par rapport à cette dernière, l'objectif d'une méthode analytique peut se résumer en sa capacité à quantifier chacune des quantités inconnues présentes dans un échantillon (Choisnard, 2011).

La mise en œuvre d'une méthode de dosage peut se décomposer en quatre grandes phases généralement successives telles qu'illustrées dans la Figure 3 (Eurachem, 1998):

- une phase de *sélection* où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis ;
- une phase de *développement*, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences ;
- une phase de *validation* (Validation Interne/Externe) précédée, selon les cas, d'une phase de pré-validation ;
- une phase d'application en routine (*usage en routine*), incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle (Aubert, 2007).

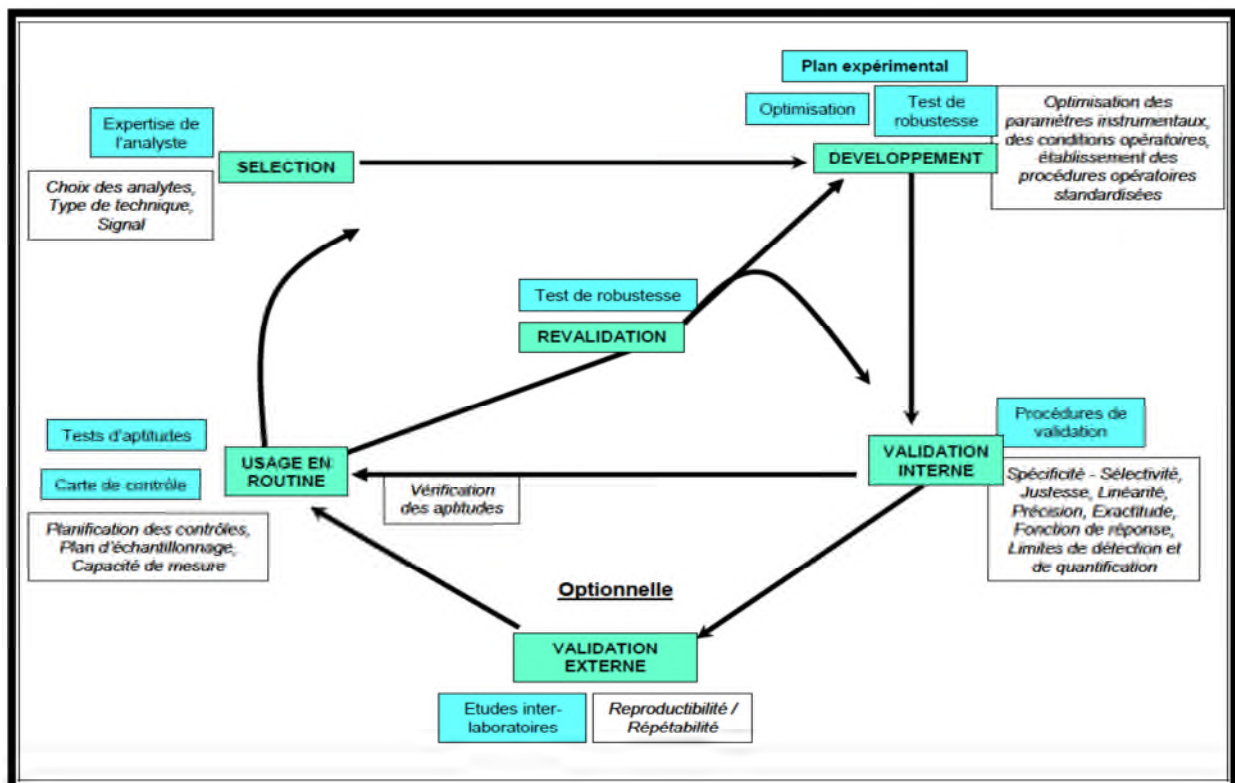


Figure 03 : Cycle de vie d'une méthode analytique (Ducellier, 2013)

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

1. Définition :

La Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est l'une des techniques récentes les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces et il est possible de la coupler à un spectromètre de masse (Safi, 2009).

2. Principe :

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force d'entraînement (due à la phase mobile) (Lindsay, 1992).

Si les molécules à séparer sont éluées par une phase mobile liquide sur une phase stationnaire (polarité) on l'appelle chromatographie en phase liquide (Safi, 2009).

3. Appareillage :

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants :

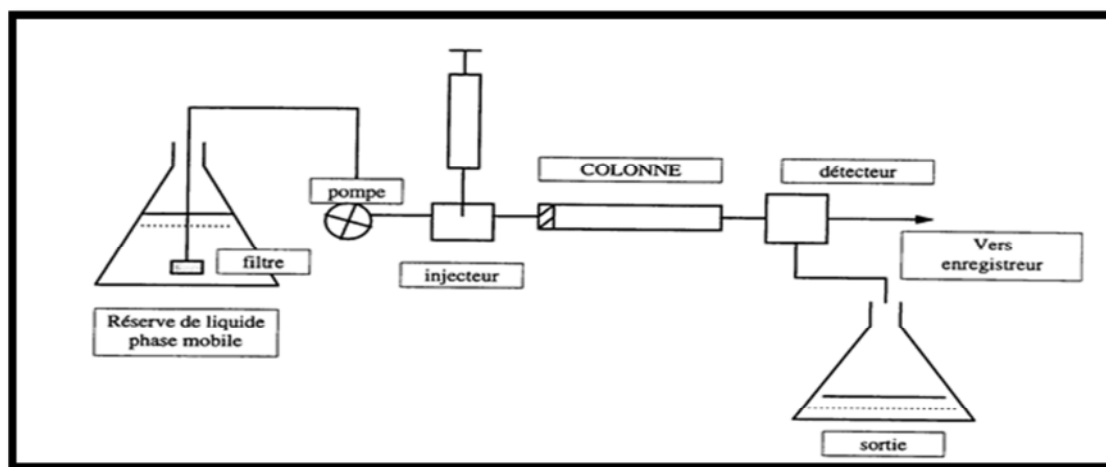


Figure 04 : Le schéma de principe de fonctionnement de l'HPLC (www.ac-nancy-metz.fr)

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile contenant soit des solvants purs soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues.
- un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée
- une colonne remplie, en acier inox, de quelques centimètres de long.
- un détecteur permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés, dans un mélange (Burgot et al, 2006).

Technique de polarimétrie

1. Définition :

La polarimétrie est une technique sensible et non destructive permettant de mesurer l'activité optique exprimée par les composés inorganiques et organiques (Stocher et al ,2007). Cette technique analytique est basée sur la mesure de la déviation du plan de polarisation d'une lumière polarisée traversant une solution composée d'une ou de plusieurs molécules chirales (Lefèvre, 2014).

2. Activité optique :

Une molécule est active si elle ne possède ni plan, ni centre de symétrie: il existe dans la molécule un carbone asymétrique dont les quatre substituants sont différents. Il peut alors exister deux formes géométriquement distinctes, symétriques l'une de l'autre par rapport à un plan, qui sont deux énantiomères (Harold, 2000).

Une substance active fait tourner le plan de polarisation d'un faisceau de lumière polarisée rectilignement (voir Figure 05) (Stocher et al, 2007).

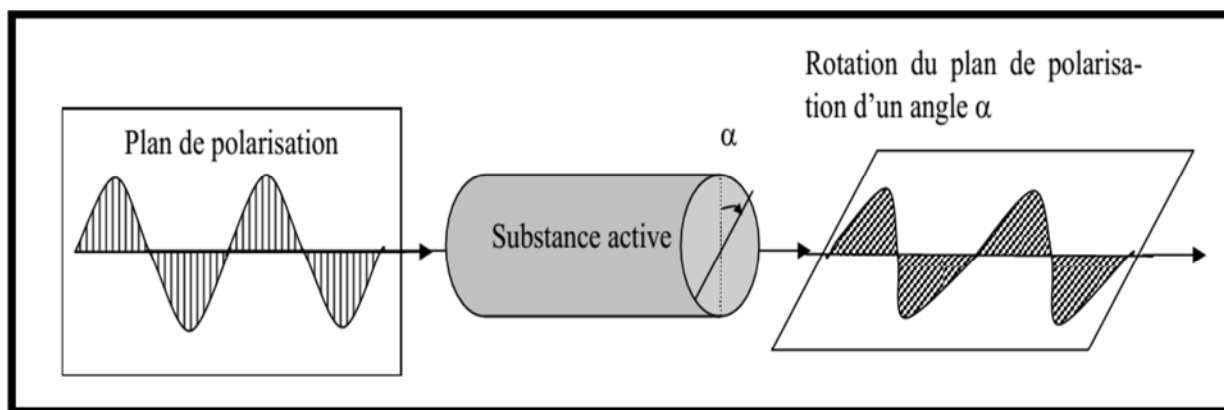


Figure 05 : Rotation du plan de polarisation par la substance active. (www.deltalabo.fr)

3. Pouvoir rotatoire :

Un composé est optiquement actif lorsqu'il provoque une rotation angulaire, appelée pouvoir rotatoire, du plan de polarisation d'une lumière monochromatique préalablement polarisée par un cristal biréfringent appelé polariseur (Ouahes et al, 2003).

Le pouvoir rotatoire est considéré comme positif (+), et les substances dites dextrogyres pour celles qui dévient le plan de polarisation dans le sens des aiguilles d'une montre) .Il est négatif (-), et les substances dites lévogyres pour la déviation inverse (Pharmacopée européenne 8.0).

Dans les substances optiquement actives, l'angle d'inclinaison de l'onde lumineuse est modifié. Selon le modèle de l'appareil, le deuxième filtre sera soumis à une rotation (manuelle ou automatique) jusqu'à l'annulation de la lumière arrivant sur le détecteur (Stocher et al, 2007).

4. Principe

Le polariseur transforme la lumière naturelle en lumière polarisée linéairement, propriété détectable seulement si on interpose sur le trajet du faisceau un autre polariseur appelé analyseur. Celui-ci est un faisceau lorsqu'il est tourné de manière à ce que sa polarisation soit à 90° à celle du polariseur. On dit alors que l'analyseur et le polariseur sont croisés. Au moment où on glisse l'échantillon optiquement actif sur le trajet du faisceau il provoque une rotation du plan de polarisation (Pérez, 1991).



*Partie
expérimentale*

Présentation de l'organisme d'accueil « Sanofi »

Employant plus de 100 000 collaborateurs répartis dans cent pays et réalisant un chiffre annuel de plus de 29 milliards d'Euros, Sanofi est un des leaders mondiaux de l'Industrie Pharmaceutique et numéro un en Europe. Il est reconnu pour ses activités de recherche, de développement et de commercialisation de produits à visée essentiellement thérapeutique. Sanofi possède des atouts fondamentaux dans le domaine de la santé avec sept plate formes de croissance : la prise en charge du diabète, les vaccins humains, les produits innovants, la santé grand public, les marchés émergents, la santé animale et le nouveau Genzyme (biotechnologies).

Sanofi s'est implanté en Algérie au début des années 90. Elle est aujourd'hui présente à travers trois entités juridiques locales, à savoir : Sanofi Aventis Algérie SPA, Winthrop Pharma Saïdal et le bureau de liaison Sanofi Winthrop Industrie.

Premier laboratoire dans le classement des ventes de médicaments en Algérie, la production locale de l'entreprise pour 2012 s'élevait à 40 millions d'unités.

Sanofi Algérie comprend deux usines tandis que l'ouverture d'un complexe industriel est à l'étude. Parmi les deux unités, une usine produisant les formes liquides et une autre produisant les formes sèches. On y compte plus de 670 collaborateurs et un portefeuille de 162 médicaments, dont 52 produits localement.

On a effectué le stage au sein du laboratoire de physico-chimie sur le site d'Ain Benian, qui produit les formes liquides. Ce laboratoire de physico-chimie fait partie avec le laboratoire de microbiologie des deux unités du laboratoire de contrôle qualité. On y retrouve un responsable contrôle qualité, deux superviseurs (physico-chimie et microbiologie) ainsi que des analystes.

Les domaines d'activité du laboratoire de physico chimie portent principalement sur le contrôle des caractéristiques physico-chimiques des produits fabriqués, mais aussi des matières servant à leur fabrication.

La mise en œuvre des techniques analytiques permet alors de vérifier la conformité des produits par rapport à des spécifications ou des exigences préétablies.



*Matériels et
méthodes*

A. Etude pratique de validation de dosage des parabènes

Les parabènes se sont des esters de l'acide *para*-hydroxybenzoïque, naturellement présents dans certains fruits et présentant une bonne activité antimicrobienne. La synthèse chimique de différents dérivés de POB ou paraoxybenzoates (méthyle, éthyle, propyle, butyle, isopropyle, isobutyle...) a favorisé leur utilisation comme conservateurs, depuis les années 1920 à ce jour, aussi bien dans l'industrie agroalimentaires, que dans l'industrie des cosmétiques et du médicament (**Avenue, 2011**).

De plus en plus des études tendent à confirmer les parabènes comme *perturbateurs endocriniens* (PE), hormonomimétiques des œstrogènes et/ou de la testostérone, responsables d'une reprotoxicité indiscutable : modifications de la qualité du sperme, des stérilités et des malformations (Cryptorchidie chez l'homme), des retards de fécondation, une précocité anormale de la puberté chez la femme...etc.

De plus ils sont suspectés de cancers œstrogène-dépendant, de cancer de la prostate, de l'ovaire et du sein. Le parahydroxybenzoate peut provoquer aussi des réactions allergiques (éventuellement retardées) et, exceptionnellement, des réactions immédiates avec urticaire et bronchospasmes (**Harvey, 2012**).

Comparé à celle bisphénol A, la demi-vie des parabènes est brève. Ils s'éliminent rapidement. C'est surtout leur absorption quotidienne avec d'autres PE qui pose problème (**Darbre, 2004**).

Il convient donc d'une part de bien définir les doses journalières cumulées admissibles et d'autre part de mettre au point une ou des techniques de dosage routinier de fiabilité confirmée d'où la nécessité de leur validation.

Objectif:

Dans cette étude, et dans le cadre défini par le laboratoire d'accueil pour la validation du dosage de ces parabènes par HPLC, nous nous sommes limités à l'estimation des critères suivants:

- linéarité
- fidélité
- exactitude

II. Matériels et méthodes

1. Réactifs analytiques:

- Acide heptane sulfonate de sodium
- Acide acétique glacial
- Méthanol
- Acétonitril
- Eau purifiée

2. Principe actif et excipients (formule du médicament) :

- Alpha amylase
- para hydroxybenzoate de méthyle de sodium (POBM Na)
- para hydroxybenzoate de propyle de sodium (POBP Na)
- Acide citrique monohydrate
- Colorant jaune orangé S
- Glycérol
- Essence de mandarine
- Saccharose

3. Appareillage :

Les dosages sont effectués avec une chromatographie liquide a haute performance (HPLC) de marque WATERS (voir l'annexeVI), de code interne HP.30 qui permet la détection des pics chromatographiques a l'aide d'un détecteur UV visible à une longueur d'onde de 256 nm. La colonne utilisé est en acier inoxydable μ Bondapack C18, 50 mm x 3.9 mm , 5 μ m, avec un volume d'injection de 10 μ l pour un débit de 1 ml/min de la phase mobile (**Procédure Sanofi a**).

III. Techniques :

On distingue deux étapes principales :

- analyses physico-chimiques ou la mise en pratique de la méthode à valider ;
- analyses statistique de confirmation et de conformité des résultats obtenus par la méthode.

Ces deux étapes sont codifiées par les guides *Q2_R de l'ICH*.

1. Dosages des POB par HPLC:

1.1 But :

- s'assurer que les concentrations détectées sont conformes aux concentrations injectées ;
- s'assurer que la technique reste valable pour le produit-médicament (environnement hétérogène) ;
- s'assurer que deux dérivés différents sont détectés et dosés comme tels.

1.2 Principe :

Le mélange à séparer est injecté dans la colonne ou la phase mobile l'entraîne à travers, les constituants de ce mélange se déplacent moins vite que la phase mobile et leurs vitesses de déplacement diffèrent d'un composant à un autre (phénomène de rétention), ils seront élués et séparés les uns après les autres et on obtient des chromatogrammes grâce à un détecteur couplé à un enregistreur. L'analyse automatique des surfaces des pics obtenus à une longueur d'onde donnée renseigne sur les concentrations (Colin, 2003).

1.3 Mode opératoire :

1.3.1 Préparation des solutions :

- le mode opératoire nécessite deux solutions de différentes concentrations 0.1% et 0.2% de sel anhydre d'acide heptane sulfonique sodé pure (Global Quality Document, 2012).

- *préparation de la phase mobile :*
 - solution 0.1 % (m/v) de sel anhydre d'acide heptane sulfonique sodé pure 1500ml.
 - acétonitrile pure 500ml.
 - acide acétique glacial pure 20ml (**Procédure Sanofi a**).

- *Phase stationnaire :*

On a utilisé une colonne en acier inoxydable μ Bondapak C18 de longueur 50 mm x 3.9 mm ,5 μ m qui contient le gel de silice (**Global Quality Document, 2012**).

- *Préparation du témoin (Procédure Sanofi a) :*
 - mettre 0.473g de alpha amylosedans une fiole de 100ml
 - mettre 0.046 d'acide citrique monohydrate
 - mettre 0.005g de colorant jaune S
 - 9g de glycerol
 - mettre 0.5g de essence de mandarine
 - mettre 64g de saccharose dans un bécher
 - ajouter de l'eau
 - agitation jusqu'à limpidité de la solution

1.4 Test de linéarité :

But :

Déterminer la concentration en analyte au-delà de laquelle la relation entre la concentration trouvée et la concentration théorique est linéaire (rapport de proportionnalité).

Le test effectué est répété sur 3 jours différents sur les conservateurs seuls et sur la forme pharmaceutique reconstituée (médicament) :

- chaque jour 5 prises d'essai contenant respectivement 60%, 80%, 100%, 120% et 140% de la quantité théorique du conservateurs (solution témoin),
- 5 autres prises d'essai contenant les mêmes quantités de conservateurs auxquelles il faut ajouter la solution témoin (solution essai),

3 mesures pour chaque concentration soit un total 10 analyses par jour (**Global Quality Document, 2012**).

Le but est d'obtenir des valeurs selon une gamme de dilution, en fonction des différentes concentrations connues.

➤ *Préparation de solutions de référence :*

- 1) mettre dans les fioles séparées de 100ml, des prises d'essai selon des concentrations suivantes :

Tableau 1: Prises d'essai de paraoxybenzoate de methyl sodique et paraoxybenzoate de propyl sodique.

ECHANTIONNAGE		
Concentrations (%)	Pesée de POBM Na (g)	Pesée de POBP Na (g)
60	0,0564	0,0180
	0,0564	0,0180
	0,0564	0,0180
80	0,0752	0,0240
	0,0752	0,0240
	0,0752	0,0240
100	0,0940	0,0300
	0,0940	0,0300
	0,0940	0,0300
120	0,1128	0,0360
	0,1128	0,0360
	0,1128	0,0360
140	0,1316	0,0420
	0,1316	0,0420
	0,1316	0,0420

- 2) une quantité suffisante pour 100 ml de méthanol;
- 3) agitation ;
- 4) mettre 1 ml de POBM Na et 1 ml de POBP Na dans les fioles de 20ml ;
- 5) une quantité suffisante pour 20ml de la solution 0.2% ;
- 6) agitation(**Procédure Sanofi a**).

➤ *Préparation des solutions essais :*

- 1) mettre dans les fioles de 100ml, des prises d'essai selon les concentrations suivantes :

Tableau 2: Prises d'essai de paraoxybenzoate de methyl sodique et paraoxybenzoates de propyl sodique.

ECHANTILLONAGE		
Concentrations (%)	Pesée de POBM Na (g)	Pesée de POBP Na (g)
60	0,0564	0,0180
	0,0564	0,0180
	0,0564	0,0180
80	0,0752	0,0240
	0,0752	0,0240
	0,0752	0,0240
100	0,0940	0,0300
	0,0940	0,0300
	0,0940	0,0300
120	0,1128	0,0360
	0,1128	0,0360
	0,1128	0,0360
140	0,1316	0,0420
	0,1316	0,0420
	0,1316	0,0420

- 2) une quantité suffisante du méthanol pour 100 ml ;
- 3) agitation de la solution ;
- 4) mettre 1 ml de POBM Na et 1 ml de POBP Na et **1ml de témoin** dans une fiole de 20ml ;
- 5) une quantité suffisante de la solution de 0.2% pour 20ml ;
- 6) agitation (**Procédure Sanofi a**).

1.5 Test de l'exactitude :

But : vérifier l'étroitesse de l'accord entre la valeur mesurée et la valeur admise comme exacte. Elle porte sur l'évaluation des résultats de la linéarité.

1.6 Test de fidélité:

a. La fidélité intermédiaire :

But : vérifier l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essai effectués sur deux jours en faisant varier les conditions de mesure (analyste ou opérateur).

- La fidélité est étudiée sur le médicament (6 échantillons du même lot);
- effectuée sur deux jours avec 6 essais par jour;

6 pesées de la concentration de référence (100%) sur la forme reconstituée (**Global Quality Document, 2012**).

➤ *Préparation des solutions:*

Solution POBM Na (a) :

dissoudre 0.094g du POBM sodique, dans du méthanol pure et compléter à 100 ml avec le même solvant (**Procédure Sanofi a**).

Solution POBP Na (b) :

dissoudre 0.030g du POBP sodique, dans du méthanol pure et compléter à 100 ml avec le même solvant (**Procédure Sanofi a**).

Solution de référence :

diluer 1 ml de la solution (a) et 1 ml de la solution (b) et compléter à 20 ml avec une solution à 0.2 % (m/v) de sel anhydre d'acide heptane sulfonique sodé pure **(Procédure Sanofi a)**.

Solution essai :

diluer 1 ml de médicament, ajouter 2 ml de méthanol pure et compléter à 1ml avec une solution à 0.2 % (m/v) de sel anhydre d'acide heptane sulfonique sodé pure, Six flacons de sirop six solutions a injecter **(procédure Sanofi a)**.

On détermine le dosage a partir des surfaces obtenus par la formule (voir l'annexe 4)

II. Analyse statistique ou validation proprement dite:

1.Test de linéarité :

Une étude statistique sur la linéarité (le conservateur seul et la forme pharmaceutique reconstituée) est réalisée pour chaque concentration.

La linéarité est estimé par les parametre statistiques suivant :

1.1 Determination de la droite de régression linéaire:

A partir des valeurs expérimentales, on trace les droites de régression pour les conservateurs et la forme reconstituée et on cherche le coefficient de corrélation et l'équation de la droite **(Tenenhaus, 1998) :**

$$y = a x + b$$

1.2 Comparaison de l'ordonnée à l'origine :

Test de Student (t) :

Ce test permet de verifier si l'ordonnée a l'origine n'est pas significativement différent de zéro **(Gael, 2011)**.

condition de validation est : si $t_{\text{calculé}} \leq t_{\text{tabulé}}$

$t_{\text{calculé}}$: représente la valeur calculé par la formule (voir l'annexe 2)

$t_{\text{tabulé}}$: représente la valeur de référence tirée de la table statistique au risque $\alpha=5\%$

1.3. Test d'homogénéité des variances :

Test de Cochran :

La variance mesure la dispersion des valeurs mesurées autour de leur valeur moyenne. Le test de Cochran permet de vérifier l'homogénéité des variances des valeurs individuelles des essais de chaque groupe étudié, c'est-à-dire de vérifier que ces variances sont peu différentes entre elles. Il consiste à comparer le critère de Cochran de ces variances avec celui lu sur la table correspondante à un risque $\alpha=5\%$ (**Anne, 2006**).

Condition de validation : La décision se fait par rapport à une valeur critique que l'on trouve dans la table de référence avec $C_{\text{calculé}} \leq C_{\text{tabulé}}$

1.4 Test d'existence d'une pente significative :

Test de Fisher :

Ce test consiste à comparer deux variances "variance intra-groupes" et "variance inter-groupes" (**Bouklouze, 2006**).

Condition de validation : si $F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}}$ le modèle est linéaire au risque d'erreur de 5%

1.5 Test de validité de la droite de régression :

Test de Fisher :

Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement due aux facteurs discriminants par exemple (l'analyste, le jour....) et les erreurs expérimentales (**Bouklouze, 2006**).

Condition de validation : si $F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}}$ le modèle est linéaire au risque de 5%

2. Fidélité :

2.1 Le coefficient de variation (cv) :

Il est souvent utilisé pour mesurer la variabilité d'une série de données, le (cv) est l'écartype exprimé comme un pourcentage de la moyenne, une faible valeur étant un critère de fidélité (voir l'annexe 4) (**Fleury,1987**).

3. L'exactitude :

On évalue l'exactitude en comparant la valeur expérimentale à la valeur de référence par un recouvrement, ou en montrant que la valeur théorique se trouve dans l'intervalle de confiance de 95 % de la valeur expérimentale.

On calculera :

a. Le recouvrement :

On peut exprimer quantitativement l'exactitude au moyen d'un biais qui exprime la différence entre la moyenne mesurée et la valeur exacte (**Joachim et al,2005**).

b. La moyenne :

C'est le paramètre de position le plus classique. Intuitivement, elle indique où se trouve le milieu des valeurs mais ne donne aucune information sur la répartition des données.

La moyenne arithmétique d'un ensemble de nombres est égale à la somme des valeurs divisée par le nombre de valeurs (**Jean-Marc, 2010**).

B. Etude pratique de validation de dosage de saccharose :

I. Matériels et méthodes :

1. Excipients :

- carbocystéine
- hydroxyde de sodium en solution 30%
- hydroxyde de sodium en pastilles
- colorant rouge cochenille A
- parfum cerise
- parfum framboise
- vanilline parahydroxybenzoate de méthyl

2. Produit fini :

Rhinathiol enfant 2% carbosysteine (sirop)

3. Appareillage :

2.1 Le polarimetre :

Le polarimètre utilisé est automatique et numérique (voir l'annexe VI), dispose d'un principe de mesure innovant pour mesurer les substances optiquement actives, indépendamment de l'angle de rotation de l'échantillon, et permet de réduire le temps de mesure à une seconde, ce qui permet de gagner beaucoup de temps en comparaison avec les polarimètres traditionnels.

Tous les réglages sur l'appareil seront réalisés, à l'aide d'un écran tactile. Après chaque mesure, on peut imprimer le résultat.

Le polarimetre utilisé, contient un tube de 1dm sur la raie D du sodium (589nm)

2.2 La polarimetrie :

La polarimetrie est un procédé qui repose sur l'interaction des centres chiraux avec la lumière polarisée, est utilisé pour l'analyse des solutions contenant au moins un carbone asymétrique (exemple le saccharose).

I. Mode opératoire :

La validation de dosage inclut la vérification des caractéristiques suivantes :

- Spécificité
- Linéarité
- Répétabilité
- Stabilité

1. Préparation des solutions :

1.1 Préparation du témoin :

Dans une fiole de 100ml contenant 20ml d'eau purifiée, et :

- mettre 2g de carbocysteine ;
- ajouter 0.45g d'hydroxyde de sodium ;
- ajouter 0.05g de colorant rouge cochenille A ;
- ajouter 0.472 g de parfum cerise ;
- ajouter 0.949g de parfum de framboise ;
- ajouter 0.05g de vaniline ;
- ajouter 0.15g de parahydroxybenzoate de méthyle ;
- quantité suffisante pour 100ml de l'eau purifiée ;
- agiter.

2. Test de spécificité :

- mettre 5ml de témoin dans une fiole de 100ml
- quantité suffisante de l'eau pour 100ml.
- lire l'angle de rotation

3. Test de linéarité :

➤ But :

Déterminer la concentration en analyte au-delà de laquelle la relation entre la concentration trouvée et la concentration théorique est linéaire (rapport de proportionnalité).

Le dosage consiste a :

- Mettre les prises d'essais (voir tableau III) de produit fini dans des fioles de 100ml ;

Tableau 3 : Les prises d'essais pour chaque concentration du produit fini

Pesée	Concentration (%)
1ml	20
2ml	40
5ml	100
8ml	160
10ml	200

- Quantité suffisante pour 100ml de l'eau purifiée ;
- lire l'angle de rotation par le polarimètre.

4. Test de répétabilité :

La répétabilité représente la qualité de l'accord entre les mesures répétées.

Le dosage consiste a :

- mettre 5ml de produit fini dans une fiole de 100ml ;
- quantité suffisante pour 100ml de l'eau purifiée;
- Lire l'angle de rotation par le polarimètre;
- Répéter 6 fois la préparation de l'essai .

5. Test de stabilité :

La stabilité de la solution sera effectuée sur 3 essais indépendants :

- mettre 5ml du produit fini dans une fiole de 100ml ;
- quantité suffisante pour 100ml de l'eau purifiée ;
- conserver les solutions à température ambiante ;
- Lire l'angle de rotation pour les trois essais à t=0h, t=2h et t=4h.

II. Démarche statistique :

1. Test de spécificité :

Aucune interférence ne doit être observée dans les conditions normales de dosage.

2. Test de linéarité :

L'étude de la linéarité consiste à avoir :

- Le coefficient de la linéarité de l'angle de rotation en fonction de la prise d'essai.
- le coefficient de corrélation de la droite supérieur à 0.99


3. Test de Répétabilité :

La concentration en saccharose exprimée en g/100ml dans la forme pharmaceutique est donnée par la formule (voir annexe V).

la concentration en saccharose doit être comprise entre 65 et 75g/100ml et le coefficient de variation doit être inférieur à 5%.

4. Test de stabilité :

A partir de la droite de régression linéaire de l'angle de rotation en fonction du temps. Le recouvrement moyen doit être compris entre 95 et 105% à $t=2h$ et $t=4h$.

A decorative graphic of a scroll, with the text centered on a white rectangular banner that has rounded corners and a slight shadow. The banner is flanked by vertical bars on the left and right, each with a circular end, suggesting the scroll's binding.

*Résultats et
discussions*

A. Résultats de dosage des parabènes par HPLC**I. Résultats de dosage par HPLC****1. Résultats de test de linéarité:**

L'étude de test de linéarité a donné les résultats suivants :

Tableau 4 : Résultats de test de linéarité paraoxybenzoate de méthyl sodique seul / paraoxybenzoate de méthyl sodique et excipients

Concentrations (%)	Pesée (g)	Surfaces POBM Na seul	Surfaes POBM Na +excipients
60	0,0564	1359144,29	1355706,52
	0,0564	1377705,18	1374736,06
	0,0564	1378184,53	1375529,01
80	0,0752	1857489,81	1852559,81
	0,0752	1878687,96	1879562,28
	0,0752	1875622,24	1876365,16
100	0,0940	2305773,26	2386652,40
	0,0940	2318445,85	2346205,01
	0,0940	2396590,49	2417351,21
120	0,1128	2730471,55	2784921,02
	0,1128	2754662,58	2772508,49
	0,1128	2826015,32	2854411,87
140	0,1316	3386822,42	3332779,83
	0,1316	3239127,15	3275991,05
	0,1316	3368456,35	3321970,02

Tableau 5: Résultats de test de linéarité paraoxybenzoate de propyl sodique seul / paraoxybenzoate de propyl sodique et excipients

Concentrations (%)	Pesée (g)	Surfaces POBP NA	POBP Na +excipients
60	0,0180	354177,53	352532,62
	0,0180	334738,47	331194,18
	0,0180	363044,06	366400,89
80	0,0240	482259,84	482619,81
	0,0240	455109,16	453555,85
	0,0240	446590,55	448488,50
100	0,0300	599666,04	598514,20
	0,0300	590350,35	594343,63
	0,0300	589611,57	590013,67
120	0,0360	703936,70	706147,31
	0,0360	697063,87	696419,19
	0,0360	681905,64	688053,19
140	0,0420	837984,25	831041,35
	0,0420	825407,87	829747,64
	0,0420	824588,86	825203,88

Pour une série de 15 essais effectués sur la forme libre et sur la forme reconstituée, pour les deux conservateurs testés, les résultats des dosages (Tableau 4 et 5) montrent que l' HPLC donne:

- des surfaces de pics très proches pour des concentrations en conservateurs identiques;
- des surfaces proportionnelles aux concentrations (d'une concentration à une autre);
- des surfaces proportionnelles aux concentrations, que ce soit pour la forme libre ou la forme reconstituée. Ce dernier point peut être expliqué par l'absence d'interférences avec la matrice, c'est-à-dire que les excipients n'influent pas sur les conservateurs.

2. Résultats de test de fidélité :

La fidélité de la méthode de dosage de POBM Na et POBP Na est déterminée en réalisant deux séries de six dosages du même lot de produit fini en faisant varier les analystes sur deux jours différents.

Tableau 6 : Dosage de paraoxybenzoate de méthyl sodique

Produit fini	Titre en POBM Na (g/100ml)	
	Analyste 1	Analyste 2
Test		
1	0,088	0,091
2	0,089	0,090
3	0,091	0,091
4	0,090	0,090
5	0,089	0,090
6	0,089	0,090

Tableau 7 : Dosage de paraoxybenzoate de propyl sodique

Produit fini	Titre en POBP Na (g/100ml)	
	Analyste 1	Analyste 2
Test		
1	0,030	0,030
2	0,029	0,030
3	0,030	0,030
4	0,029	0,029
5	0,030	0,030
6	0,030	0,030

On constat une quasi-identité entre les dosages. On peut dire sans se tromper que l'analyste, s'il manipule correctement, n'a aucune influence sur la technique .recouvrement

II. Analyse statistique

1. Résultats d'analyse de linéarité :

Pour prouver que la méthode de dosage est réellement linéaire cinq paramètres doivent être vérifiés, à savoir :

- détermination de la droite de régression linéaire ;
- test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec l'origine réelle par student;
- test d'homogénéité des variances ;
- test d'existence d'une pente significative ;
- test de validité de la droite de régression .

a. Détermination de la droite de régression linéaire :

➤ POBM Na :

Les paramètres de l'équation de la linéarité sont vérifiés selon les formules données en Annexe I, les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux suivants qui sont fait par l'excel :

Tableau 8: Paramètres de l'équation de linéarité de paraoxybenzoate de méthyl sodique

$y = ax + b$	$Y = 24097x - 72802$
Pente (a)	24097
Ordonnée à l'origine (b)	-72802
Coefficient de corrélation (R^2)	0.9952

On dispose alors d'un graphe qui représente la corrélation entre les valeurs de référence (concentrations) et les valeurs observés (surfaces) pour POBM Na seul

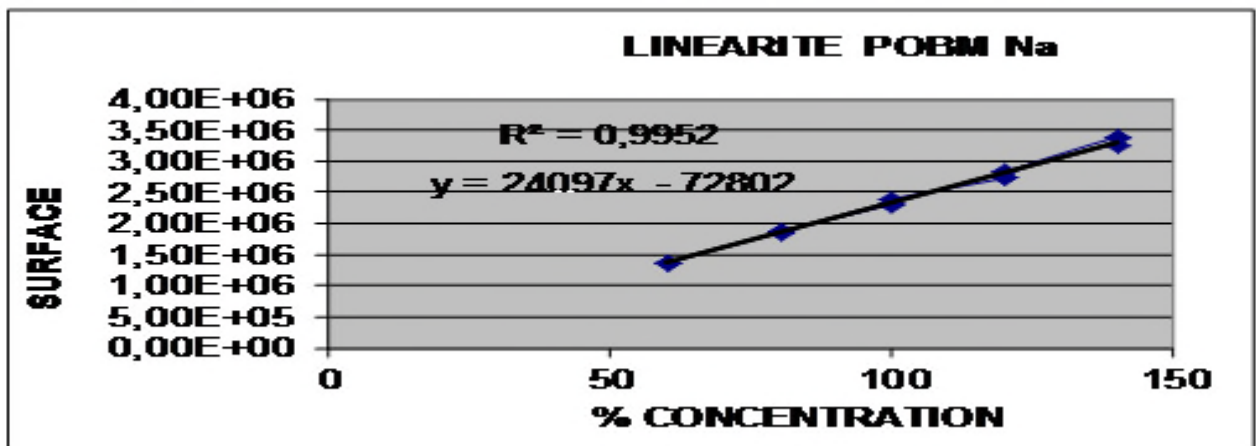
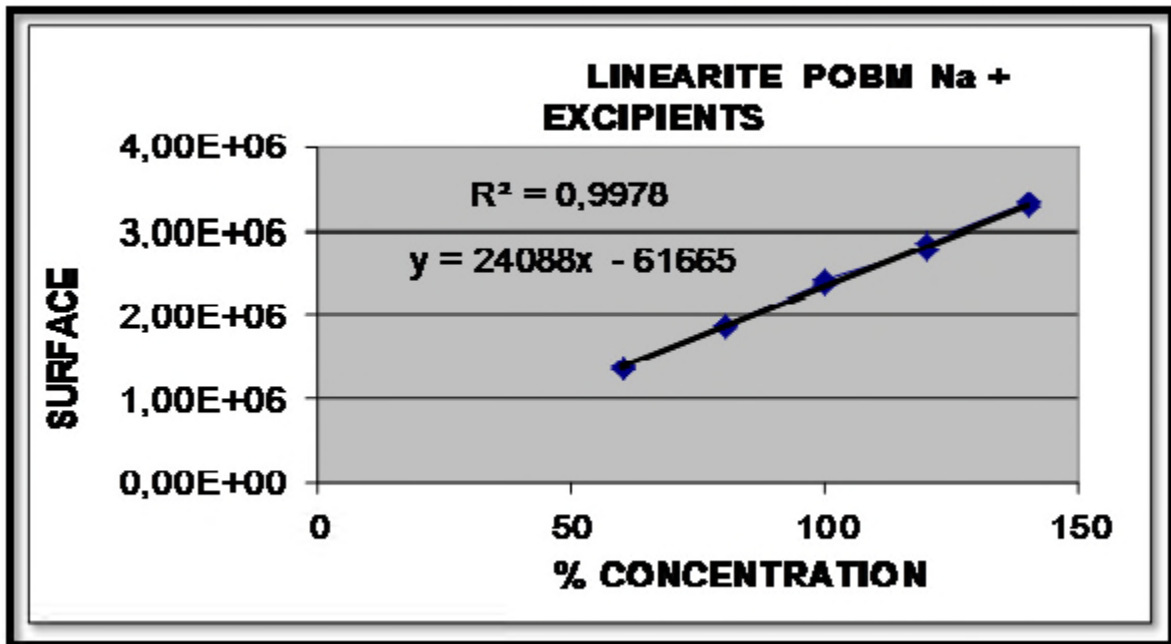


Figure06: Evolution de la surface en fonction de la concentration de paraoxybenzoate de méthyl sodique

Tableau 9 : Paramètres de l'équation de linéarité de la forme reconstituée :

$y = a x + b$	$Y = 24088x - 61665$
Pente (a)	24088
Ordonnée à l'origine (b)	-61665
Coefficient de détermination (R^2)	0.9978

le graphique obtenu pour la forme reconstituée :

**Figure 07** : Evolution de la surface en fonction de la concentration de la forme reconstituée

➤ POBP Na :

Tableau 10 : Paramètres de l'équation de linéarité de paraoxybenzoate de propyl sodique

$y = a x + b$	$Y = 5951x - 9402$
Pente (a)	5951
Ordonnée à l'origine (b)	-9402
Coefficient de corrélation (R^2)	0.9940

On dispose alors d'un graphique qui représente la corrélation entre les valeurs théoriques et les valeurs observés pour POBP Na seul :

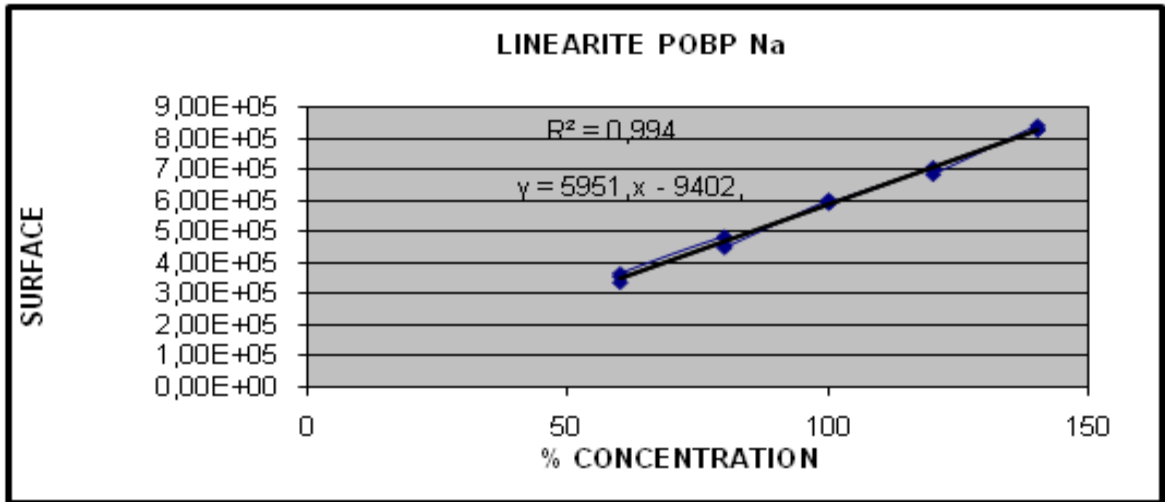


Figure 08 : Evolution de la surface en fonction de la concentration de paraoxybenzoate de propyl sodique

Tableau 11: Paramètres de l'équation de linéarité de la forme reconstituée

$y = a x + b$	$Y = 5962x - 9995$
Pente (a)	5962
Ordonnée à l'origine (b)	-9995
Coefficient de corrélation (R^2)	0.9950

Le graphe obtenu pour la forme reconstituée :

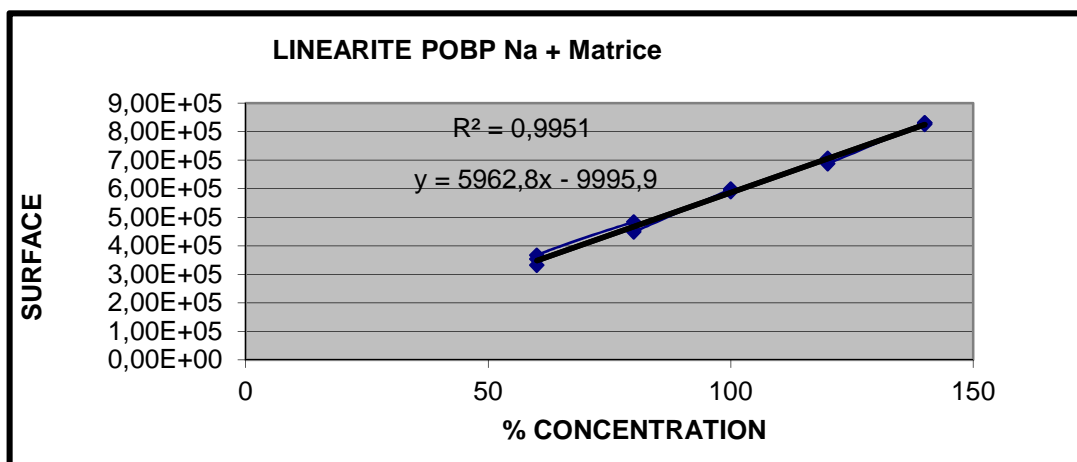


Figure 09 : Evolution de la surface en fonction de la concentration de la forme reconstituée

La valeur du coefficient de corrélation R^2 montre qu'il y a un fort lien de linéarité entre les deux distributions, concentration et surface, qu'on peut représenter par une droite.

b. Test de Student pour comparaison de l'ordonnée à l'origine avec l'origine réelle :

La comparaison de l'ordonnée à l'origine avec « le zéro » se fait par le test de Student selon les formules données en Annexes II, les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux suivants :

➤ POBM Na :

Tableau 12: Test de Student pour paraoxybenzoate de méthyl sodique

b ordonné a l'origine	S _b l'écartype	t _{calculé} = b / S	t _{tabulé}	n	t _{calculé} < t _{tabulé}
75937	46876.7888	1.61	2.16	15	1.61 < 2.16

Tableau 13: Test de Student pour la forme reconstituée

b	S _b	t _{calculé} = b / S	t _{tabulé}	n	t _{calculé} < t _{tabulé}
61665	28841.58599	2.13	2.16	15	2.13 < 2.16

➤ POBP Na :

Tableau 14 : Test de Student pour paraoxybenzoate de propyl sodique

b	S _b	t _{calculé} = b / S	t _{tabulé}	n	t _{calculé} < t _{tabulé}
9402	12323.74361	0.77	2.16	15	0.77 < 2.16

Tableau 15: Test de Student pour la forme reconstituée

b	S _b	t _{calculé} = b / S	t _{tabulé}	n	t _{calculé} < t _{tabulé}
9995	11886.95936	0.84	2.16	15	0.84 < 2.16

Le coefficient de Student calculé pour les deux cas est dans les fourchettes d'acceptabilité

($T_{\text{calculé}} < T_{\text{référence}}$) donc l'ordonnée à l'origine ne diffère pas significativement de zéro aussi bien pour POBM Na et POBP Na que pour les formes reconstituées. Autrement dit la technique ne dose pas l'analyte s'il n'y en a pas !

Ainsi les légères variations observées restent non-significatives et ne remettent pas en cause la linéarité observée.

Les résultats du test de *Student* comparés pour les deux types de conservateurs pourraient signifier que la linéarité de cette méthode serait meilleure pour le POBP que pour le POBM. Mais ça reste à prouver et à elle ne remet pas en cause l'adéquation de la technique pour les deux types de conservateurs.

c. Test d'homogénéité des variances :

On utilise le test de Cochran qui permet de vérifier l'homogénéité des variances (voir l'Annexe II). Les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux suivants :

➤ POBM Na :

Tableau 16: Test d'homogénéité des variances pour paraoxybenzoate de méthyl sodique seul

n (nombre d'essai)	k (nombre répétition par essai)	$C_{\text{calculé}} = S_{j \text{ max}}^2 / \sum S_j^2$	$C_{\text{tabulé}}$	$C_{\text{calculé}} / C_{(0,05 ; k ; n-1)}$
5	3	0.5578	0.6838	$0.5578 < 0.6838$

Tableau 17 : Test d'homogénéité des variances pour la forme reconstituée

n	k	$C_{\text{calculé}} = S_{j \text{ max}}^2 / \sum S_j^2$	$C_{\text{tabulé}}$	$C_{\text{calculé}} / C_{(0,05 ; k ; n-1)}$
5	3	0.4354	0.6838	$0.4354 < 0.6838$

➤ POBP Na :

Tableau 18 : Test d'homogénéité des variances pour paraoxybenzoate de propyl sodique

n	k	$C_{\text{calculé}} = S_{j \text{ max}}^2 / \sum S_j^2$	$C_{\text{tabulé}}$	$C_{\text{calculé}} / C_{(0,05 ; k ; n-1)}$
5	3	0.4498	0.6838	0.4498 < 0.6838

Tableau 19: Test d'homogénéité des variances pour la forme reconstituée

n	k	$C_{\text{calculé}} = S_{j \text{ max}}^2 / \sum S_j^2$	$C_{\text{tabulé}}$	$C_{\text{calculé}} / C_{(0,05 ; k ; n-1)}$
5	3	0.4445	0.6838	0.4445 < 0.6838

A partir des résultats de ces tableaux on constate que le test de Cochran est bien conforme et les variances des différents niveaux sont homogènes, au risque d'erreur de 5%.

L'analyse d'homogénéité des variances, pour chaque concentration démontre que l'ensemble des variances des différents groupes est valide au risque d'erreur de 5% .

En d'autres termes les valeurs obtenues par la techniques sont homogènes autour de la moyenne et donnent des écarts acceptables par les limites de la technique.

d. Test d'existence d'une pente significative :

Le test d'existence d'une pente significative se fait par le test de Fisher (voir Annexe III) et les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux suivants :

➤ POBM Na:

Tableau 20: Test de Fisher pour paraoxybenzoate de méthyl sodique seul

	DDL degré de liberté	variance	F ₁ calculé / F ₁ tabulé
Variation intergroupe	1	6.9701E+12	2860.78 > 4.67
Variation intragroupe	13	2436431438	

Tableau 21: Test de Fisher pour la forme reconstituée

	DDL	variance	F ₁ calculé / F ₁ tabulé
Variation due a la régression	1	6.9664E+12	7563.88 > 4.67
Variation résiduelle	13	921008406	

➤ POBP Na :

Tableau 22 : Test de Fisher pour paraoxybenzoate de propyl sodique seul

	DDL	variance	F ₁ calculé / F ₁ tabulé
Variation due a la régression	1	4.2512E+11	2520.25 > 4.67
Variation résiduelle	13	168681545	

Tableau 23 : Test de Fisher pour la forme reconstituée:

	DDL	variance	F ₁ calculé / F ₁ tabulé
Variation due a la régression	1	4.2672E+11	2724.55 > 4.67
Variation résiduelle	13	156620345	

L'écart obtenu (F₁ calculé est très supérieur à F théorique au risque de 5%) montre bien une relation linéaire entre surface et concentration. La pente existe et elle est significative.

e. Test de validité de la droite de régression :

Le test de la droite de régression se fait par le test de Fisher (voir annexe IV), les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux suivants :

➤ POBM Na :

Tableau 24: Test de Fisher pour paraoxybenzoate de méthyl sodique seul

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	F _{2calculé} / F _{2tabulé}
Erreur de la régression	3	1.071E +10	3569974052	1.5367 < 3.71
Erreur expérimentale	10	2.3231E +10	2323067931	

Tableau 25: Test de Fisher pour la forme reconstituée

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	F _{2calculé} / F _{2tabulé}
Erreur de la régression	3	4386640684	1462213561	1.6338 < 3.71
Erreur expérimentale	10	8949673317	894967332	

➤ POBP Na :

Tableau 26 : Test de Fisher pour paraoxybenzoate de propyl sodique seul

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	$F_{2\text{calculé}} / F_{2\text{tabulé}}$
Erreur de la régression	3	1542930673	207757723	1.3465 < 3.71
Erreur expérimentale	10	623273169.2	154293067	

Tableau 27 : Test de Fisher pour la forme reconstituée

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	$F_{2\text{calculé}} / F_{2\text{tabulé}}$
Erreur de la régression	3	644957283.8	214985761	1.4084 < 3.71
Erreur expérimentale	10	1526443083	152644308	

On remarque d'après les résultats des tableaux précédents que $F_{2\text{calculé}}$ est inférieur à $F_{2\text{tabulé}}$ ce qui démontre que les droites de régression obtenues sont valables.

Interprétation :

Sur la base des résultats obtenus et les analyses statistiques réalisés sur les droites de régression, nous pouvons dire que la linéarité de la technique est une droite de coefficient de régression supérieur à 0.99 confirmée par les résultats de comparaison des données à l'origine avec zéro et les résultats du test d'homogénéité des variances. Tous les tests statistiques ont donnés des valeurs toujours comprises dans les limites d'acceptation. Nos gammes sont donc satisfaisantes en termes de linéarité car l'erreur de modèle est négligeable et la méthode d'analyse présente ainsi un profil linéaire valide.

2. Résultats d'analyse de la fidélité :

Pour prouver que la méthode de dosage est fidèle il faut estimer le coefficient de variation (CV%), à partir de la moyenne et de l'écartype. C'est ce CV qui sera comparé au CV limite de référence (**Gautier, 1992**).

Tableau 28: Résultats de fidélité du dosage de paraoxybenzoate de méthyl sodique

Produit fini	Titre en POBM Na (g/100ml)		Spécifications
	Analyste 1	Analyste 2	
Test			
1	0,088	0,091	
2	0,089	0,090	
3	0,091	0,091	
4	0,090	0,090	
5	0,089	0,090	
6	0,089	0,090	
Moyenne (n=6)	0,089	0,090	0,080 - 0,103 g/100ml (Global Quality Document ID,2012)
CV % (n=6)	1,2	0,6	2,0% max (Global Quality Document ID ,2012)
Moyenne (n=12)	0,090		0,080 - 0,103 g/100ml (Global Quality Document ID ,2012)
CV % (n=12)	1,0		2,0% max(Global Quality Document ID ,2012)

Tableau 29 : Résultats de la fidélité du dosage du paraoxybenzoate de propyl sodique

Produit fini	Titre en POBP Na (g/100ml)		Specifications
	Analyste 1	Analyste 2	
Test			
1	0,030	0,030	
2	0,029	0,030	
3	0,030	0,030	
4	0,029	0,029	
5	0,030	0,030	
6	0,030	0,030	
Moyenne (n=6)	0,030	0,030	0,027 – 0,033 g/100ml(Global Quality Document ID, 2012)
CV % (n=6)	1,9	1,4	2,0% max(Global Quality Document ID, 2012)
Moyenne (n=12)	0,030		0,027 – 0,033 g/100ml(Global Quality Document ID, 2012)
CV % (n=12)	1,5		2,0% max(Global Quality Document ID, 2012)

Interprétation:

La fidélité intermédiaire est évaluée par le calcul de coefficient de variation pour une valeur du $CV < 2\%$ (valeur fixée par les normes pharmaceutiques).

D'après les deux tableaux de fidélité intermédiaires de POBM Na, de $CV=1$ et POBP Na, de $CV=1.5$, on voit que les coefficients de variation sont dans les limites d'acceptation. De ce fait les résultats confèrent à la méthode une bonne fidélité, c'est-à-dire que l'homogénéité des mesures de dosage faites par deux opérateurs distincts est conforme et le dosage reste indépendant de l'opérateur.

3. Résultats d'analyse de l'exactitude:

L'étude statistique de l'exactitude est effectuée à partir des données de la linéarité, on vérifie l'exactitude de la méthode par l'estimation du recouvrement :

➤ POBM Na :

Tableau 30: Résultats de l'exactitude paraoxybenzoate de méthyl sodique

Concentrations (%)	Pesée (g)		Surfaces		Recouvrement (%)
	Pesée des solutions étalons (g)	Pesée des solutions essais (g)	Surfaces des solutions étalons (POBM Na)	Surfaces des solutions essais (POBM Na +excipients)	
60	0,0564	0,0564	1359144,29	1355706,52	99,9239201
	0,0564	0,0564	1377705,18	1374736,06	99,784488
	0,0564	0,0564	1378184,53	1375529,01	99,8073175
80	0,0752	0,0752	1857489,81	1852559,81	99,734588
	0,0752	0,0752	1878687,96	1879562,28	99,9136749
	0,0752	0,0752	1875622,24	1876365,16	100,039609
100	0,0940	0,0940	2305773,26	2386652,40	103,50768
	0,0940	0,0940	2318445,85	2346205,01	101,197318
	0,0940	0,0940	2396590,49	2417351,21	100,866261
120	0,1128	0,1128	2730471,55	2784921,02	102,722671
	0,1128	0,1128	2754662,58	2772508,49	100,647844
	0,1128	0,1128	2826015,32	2854411,87	101,09437
140	0,1316	0,1316	3386822,42	3332779,83	98,4043276
	0,1316	0,1316	3239127,15	3275991,05	101,138081
	0,1316	0,1316	3368456,35	3321970,02	98,6199515
	recouvrement moyen				100,77
	CV (n=15)				1,2

➤ POBP Na :

Tableau 31 : Résultats d'exactitude de paraoxybenzoate de propyl sodique

Concentrations (%)	Pesée (g)		Surfaces		Recouvrement (%)
	Pesée des solutions étalons (g)	Pesée des solutions essais (g)	Surfaces des solutions étalons (POBP Na seul)	Surfaces des solutions essais (POBP Na +excipients)	
60	0,0180	0,0180	354177,53	352532,62	99,5355691
	0,0180	0,0180	334738,47	331194,18	98,9411764
	0,0180	0,0180	363044,06	366400,89	100,36704
80	0,0240	0,0240	482259,84	482619,81	99,6593949
	0,0240	0,0240	455109,16	453555,85	99,6586951
	0,0240	0,0240	446590,55	448488,50	100,008285
100	0,0301	0,0300	599666,04	598514,20	100,140613
	0,0300	0,0300	590350,35	594343,63	100,676425
	0,0300	0,0301	589611,57	590013,67	99,735745
120	0,0360	0,0360	703936,70	706147,31	100,314035
	0,0360	0,0360	697063,87	696419,19	99,9075149
	0,0360	0,0360	681905,64	688053,19	100,901525
140	0,0420	0,0420	837984,25	831041,35	99,1714761
	0,0420	0,0420	825407,87	829747,64	100,525773
	0,0420	0,0422	824588,86	825203,88	99,6002979
	recouvrement moyen				99,99
	CV (n=15)				0,5

Interprétation:

La vérification de l'exactitude de la méthode est faite par rapport à un écart maximal acceptable autour de la valeur de référence fixé par le laboratoire ($100 \pm 5\%$) (**procédure de Sanofi a**).

Le pourcentage de recouvrement moyen (pour $n=15$) est de 99,99% avec un intervalle de confiance (risque) $\pm 5\%$, d'où intervalle du pourcentage de recouvrement moyen de la méthode de [94,99-104,99]%

Les pourcentages de recouvrement moyens pour POBM (100,77%) et pour POBP (99.99%) sont très satisfaisants sur l'intervalle de 60% à 140% de la concentration de référence en conservateur, c'est-à-dire que les valeurs sont exactes et précises.

La technique a passé avec succès tous les tests de validation retenus. Tous les résultats, sans exception, ont montrés que l'HPLC est adaptée aux dosages des conservateurs utilisés dans le médicament. On voit bien que :

- les deux conservateurs sont détectés à leurs doses réelles que ce soit sous forme pure ou en mélange avec les excipients;
- le rapport de proportionnalité surface/concentration est évident et ne souffre d'aucun doute;
- la présence d'excipient n'a pas d'influence significative sur l'identification et le dosage de chaque analyte;
- mieux encore, les deux conservateurs, de structures très proches, sont distingués l'un de l'autre et dosés avec précision;
- cette technique est indépendante des opérateurs impliqués et peut être reproduite d'un laboratoire à un autre;

En finale, le dosage de POBM Na et de POBP Na par HPLC est une technique totalement valide.

Critique et limites de la méthode :

C'est une technique très performante qui permet :

- d'une part, une migration différentielle des molécules et donc leur séparation;
- d'autre part leur identification et leur dosage par spectrophotométrie.

Elle se caractérise par une très grande sensibilité aux faibles concentrations et par un temps de réponse très court. Mais elle possède ses limites :

- c'est une technique lourde avec des installations spécialisées. Elle n'est donc pas à la portée de n'importe quel laboratoire ou entreprise;
- elle nécessite un personnel bien formée;
- il faut connaître ce qu'on dose. Une molécule inconnue ne peut être dosée, surtout dans un mélange;
- il faut connaître et disposer des phases fixes et mobiles adéquates pour la migration, pour une bonne séparation.

B. Résultats de dosage de saccharose par polarimètre

1. Résultats de test de linéarité:

Tableau 32: Résultats de test de linéarité

Concentrations (%)	Pesée (g)	Angle de rotation (°)
20	1,2572	0,94
40	2,4990	1,75
100	6,2331	4,34
160	10,0527	7,05
200	12,4443	8,78

1.1 Vérification statistique de la linéarité de dosage du saccharose :

- ✓ Détermination de la droite de régression:

Les résultats d'angles de rotation en fonction de leurs prises d'essais ont donné la droite de régression suivante :

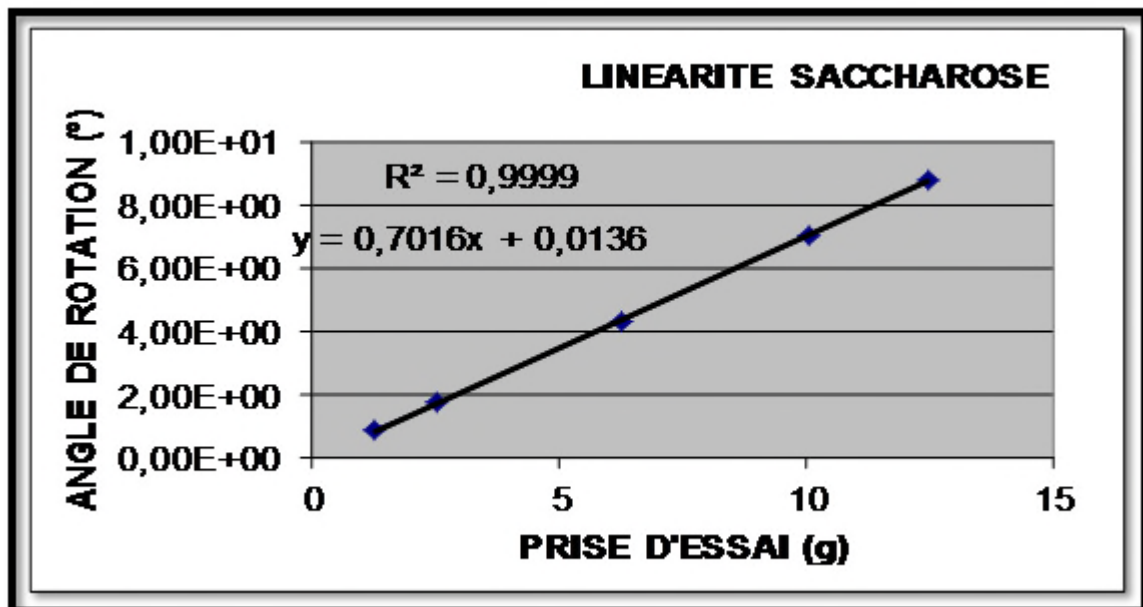


Figure10 : Droite de régression de l'angle de rotation en fonction de la prise d'essai

On a déterminé le coefficient de corrélation (R^2), la pente (a) et l'ordonnée à l'origine (b) (voir Annexe I).

Tableau33 : Résultats de l'étude de la droite de régression de saccharose

$y = a x + b$	$y = 0,7016X + 0,0136$
Pente (a)	0,7016
Ordonnée à l'origine (b)	0,0136
Coefficient de corrélation (R^2)	0.9999

Interprétation:

On dit qu'une méthode est linéaire ou présente un lien fort entre deux distributions, quand le coefficient de corrélation (R^2) est très proche de 1 (**Global quality document ID, 2012**).

La valeur de coefficient de corrélation (R^2) de la droite de regression est au voisinage de 1, donc la linéarité du dosage de saccharose dans le produit fini est vérifié et ce critère validé pour la méthode testée.

2. Résultats de test de répétabilité :

Tableau 34: Résultats de test de répétabilité de dosage du saccharose

Produit fini	Angles de rotation (°)	Teneur en saccharose (g/100ml)	Specifications
1	4,49	69,5	
2	4,36	67,4	
3	4,33	67,3	
4	4,37	67,8	
5	4,37	67,8	
6	4,41	68,3	
Moyenne (n=6)	4,39	68,0	65–75 g/100ml(Global quality document ID, 2012).
CV % (n=6)	1,3	1,2	5.0% max(Global quality document ID, 2012).

Interprétation:

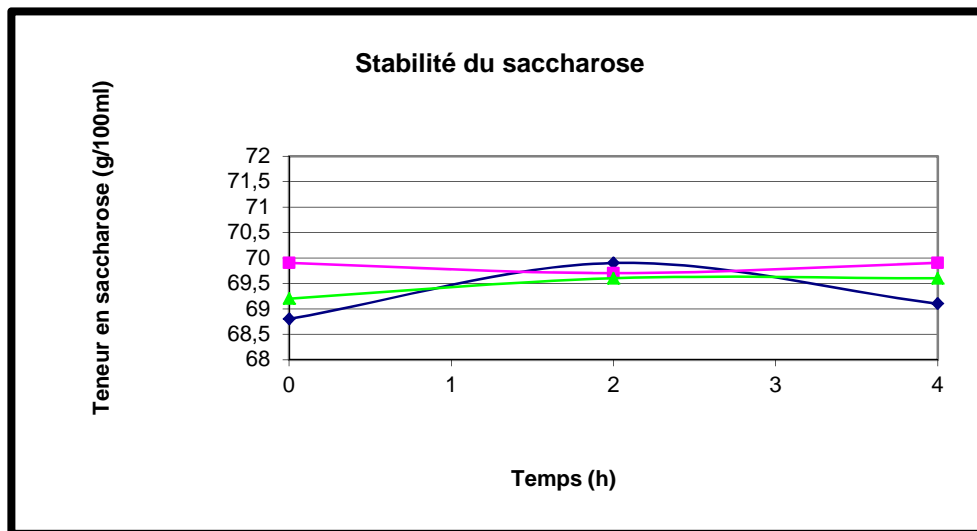
La méthode est répétable lorsque le coefficient de variation (CV) est inférieur à 5 (**Global quality document ID, 2012**).

Le coefficient de variation de ce dosage est de 1,2 inférieur à 5, par conséquent la répétabilité de ce dosage est démontrée et validé.

3. Résultats de test de stabilité :**Tableau 35:** Résultats de test de stabilité du dosage de saccharose

Essais	Prise d'essai (g)	Angles de rotations	Tt= 0h	t = 2h	t= 4h
1	6,2240	4,36	68,8	69,9	69,1
2	6,2208	4,33	69,9	69,7	69,9
3	6,2320	4,39	69,2	69,6	69,6

graphiquement ces résultats s'expriment comme suit :

**Figure 11 :** Dosage de saccharose en fonction du temps

✓ Calcul du recouvrement (%) :

Tableau 36: Résultats de recouvrement a t=2h et t=4h

Essais	t=2h	t=4h
1	101,6	100,4
2	99,7	100,0
3	100,6	100,6
Moyenne (%)	100,6	100,3

Interprétation :

Une méthode est stable lorsque le recouvrement est compris entre 95 et 105% de la valeur à $t=2h$ et $t=4h$ (**Global Quality Document ID, 2012**).

Le recouvrement de ce dosage est de 100,6 à $t=2h$ et de 100,3 à $t=4h$, ces deux valeurs sont comprises dans l'intervalle de sécurité, donc la méthode testée est stable dans le temps et ce critère validé.

Pour ce test la concentration initiale en saccharose n'a pas été modifiée. Il est donc logique que le dosage donne la même concentration, sauf s'il y a une contamination microbienne ou une dégradation chimique du saccharose.

Les résultats montrent que la technique testée détecte toujours la même concentration, dans l'intervalle de confiance retenu.

Les petites variations notées sont donc considérées comme négligeables et ne remettent pas en cause la stabilité de la technique.

4. Résultats de test de spécificité :

La spécificité s'exprime par comparaison d'angles de rotation obtenu pour témoin sans sucre avec les angles de rotations obtenus pour le produit fini, contenant l'analyte (saccharose) à doser.

D'après les résultats obtenus par la linéarité, répétabilité et stabilité et en les comparant avec le témoin négatif, on déduit que le polarimètre est spécifique de l'activité optique, dans ce cas celle du saccharose.

On doit souligner que la spécificité concerne l'activité optique et non le sucre. En d'autres termes elle ne peut être valide que pour un sucre pur ou un mélange de sucre défini quantitativement.

Mais pour l'utilisation définie la linéarité, la stabilité, la répétabilité et la spécificité de la polarométrie comme technique rapide de dosage du saccharose dans un médicament comme le Rhinatiol sont des critères totalement confirmés. Donc la validité de cette technique pour l'usage prévu est acquise.



Conclusion

CONCLUSION

L'acceptation d'une méthode analytique, quant à sa fiabilité, est décidée sur la base de procédures analytiques normalisées, 'décortiquées' par des tests statistiques d'intervalles de confiance, de mesure d'exactitude et d'estimation de fidélité au moyen de calcul des coefficients de variation. Cette approche est, en fait, basée sur l'outil statistique comme un moyen d'analyse et de prise de décision en même temps.

Cette étude a permis de valider la méthode de dosage des conservateurs POBM Na et POBP Na par l'HPLC et de valider le dosage de saccharose par le polarimètre. Les deux techniques se sont avérées conformes aux critères définis par l'ICH. Le suivi des conservateurs seuls puis en association avec les excipients a permis d'établir que le dosage conservateurs n'interfère pas avec la matrice chimique. Il en est de même pour la polarimétrie qui s'est avérée une méthode très rapide et parfaitement adaptée pour la détection et pour dosage quantitatif du signal émis par l'analyte ; l'activité optique.

Cette étude se veut un plus pour une meilleure maîtrise des performances d'une méthode de dosage déjà utilisé ailleurs (France), par le même laboratoire :

- d'une part par leur fiabilité, pour le contrôle de qualité des médicaments, dans l'intérêt des consommateurs ;

- d'autre part pour la rapidité des résultats qu'elles donnent, pour un suivi en ligne de la production, dans l'intérêt de l'entreprise.

Enfin la validation est une étape fondamentale non seulement dans le développement de nouvelles méthodes, sur le plan technique, mais aussi dans le plan des échanges et de l'uniformisation des normes et des références. En tant que telle c'est une pratique appelée à se généraliser dans tous les domaines d'évaluation et à un développement de plus en plus poussé.



Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- **Angeline A. (2007).** Études et conseils : démarches et outils.
- **Anne, B. (2006).** M2-Recherche Mouvement, Performance, Santé. cours sur logiciel R.
- **Application de la Statistique (décembre 1994 et octobre 1998).** Exactitude (justesse et fidélité) des Résultats et Méthodes de mesure, parties 1 à 6. Norme NF ISO 5725.
- **Avenue M. (2011).** parabènes et médicament : il n'y a pas lieu d'affoler la population !
Impact médecine, paris, p6.
- **Bouklouze A ; Digua K. (2006).** démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique (méthodologie et exemple pratique). les technologies de laboratoire.
- **Burgot G ; Burget J. (2006).** Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications.
Méthodes chromatographiques, électrophorèse et méthodes spectrales. Lavoisier. Pages 160.
- **Choisnard L. (2011).** Une Démarche Qualité au Service de la Chimie. Journées Qualité et Chimie, Action Nationale organisée par le CERMA Y.
- **Colin F. (2003).** The essence of chromatography. Elsevier.
- **Comité OMS (1992).** *d'experts des Spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques. Trente-deuxième Rapport.* Genève, Organisation mondiale de la Santé, (OMS, Série de Rapports techniques, N° 823).
- **Darbre P.D; Aljarrah. A; Miller W. R; Coldham N. G., Sauer and G. S. Pope. (2004).**
Concentrations of Parabens in Human Breast Tumor's; Journal of Applied Toxicology 24 .p5-13.
- **Department of Trade and Industry. (1998).** Manager's Guide to VAM, Valid Analytical Measurement Programme, LGC, and Teddington.
- **Désenfant M; Priel M; Rivier C. (2013).** de la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure .Laboratoire National d'Essai BNM-LNE.1^{er} rue.

- **Ducellier P. (2013).** Validation de méthodes analytiques « maison », dans la revue du technicien de laboratoire médical, Tech labo n°2.
- **Ermer J; miller J (2005).**method validation in pharmaceutical analysis.
- **Eurachem. (1998).**The fitness for purpose of analytic method. A laboratory guide to method validation and related topics.
- **Feinberg M. (1996).** L'assurance Qualité dans les Laboratoires Agroalimentaire et Pharmaceutiques. Edition TEC & DOC.
- **Feinberg M. (2004).** guide de validation des méthodes physico-chimiques.
- **Feinberg M. (2008).** Validation Interne des Méthode d'Analyses Techniques de l'Ingénieur, p 224-1 - 224- 23.
- **Feinberg M. (1996).** La Validation des Méthodes d'Analyse. Masson.
- **Fiche technique (2000).** Polarimètre. delta labo. Créativa Bat A – Site Agroparc. Rue Michel de Montaigne BP 21221 AVIGNON Cedex 9.
- **Fleury J. (1987).** introduction à l'usage des méthodes statistiques en pharmacie. édition médecine hygiène. Genève.
- **Gael M. (2011).** comprendre et réaliser les tests statistiques à l'aide de R Manuel biostatistique.2ème édition. Bruxelles. p414.
- **Global Quality Document ID. (2012).** CQ- SP-PF-003-b Version Number: 1,
- **Harold R; Harold M-K. (2000).** Introduction à la chimie organique. Edition DUNO. Paris. Chapitre 5 p156.
- **Harvey P-W; Everett D-J. (2012).** Parabens detection in different zones of the human breast: consideration of source and implication of findings. *J. Applied Toxicol*; 32 (5): 305-9.
- **ISO/IEC 17025. (2005).** General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO, Geneva.
- **ICH harmonised tripartite guideline. (2005).**Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). .

- **ISO /CEI. (2005).** Guide 43-1 Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison-partie 1 développement et mise en œuvre de systèmes d'essais d'aptitude.
- **Labatte, J-M (2010).** Statistique Biologie et technologie du végétal.
- **Lindsay S. (1992).**High performance liquid chromatography, Acol. London. p244.
- **Ouahes R ; Dévalez B. (2003).** Chimie générale. p177.
- **Pérez J-P. (1991)** optique géométrique, ondulatoire et polarisation. 3^{ème} édition Masson. Paris. P334.
- **Perrin M; Ferrari G; Garcia C; Chopineaux D. (2003).** Validation d'une méthode de dosage de la cocaïne dans les produits de saisies par CLHP/ UV BD Annales de Toxicologie Analytique, Vol. XV, n°3. 18 Septembre.
- **Perruchet C ; Priel M. (2008).** Estimer l'incertitude, in : Mesures – Essais., Paris, Edition AFNOR.
- pharmacopée européenne 8.p.
- Polarimétrie. (2014).Fiche TP. Lefèvre.
- Procédure de Sanofi CQ-PG-018-a : méthodologie générale de validation des méthodes d'analyse
- **Pryde A; Gilbert M. T. (1979).** application of high performance chromatography. Edition John Gauthier-Villars. Paris.
- **Safi M. (2009).** cour chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Département de chimie. p5.
- **Stocher H ; Jundt G. (2007).** Toute les physiques.2eme édition dunod. p402.
- **Tahiri F. (2002).** Validation des méthodes de contrôle de l'efficacité des vaccins viraux vivants et inactivés contre la maladie de Gumboro, Thèse de DESS, Université IBN TOFAIL, Faculté des sciences Kénitra Maroc.
- **Tenenhaus. M. (1998).** la régression PLS, Théorie et Pratique, éditions Technip.
- **Thompson .M. (2002).** S.L.R. Ellison, undR. Wood: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, Pure Appl. Chem., 835-855.

- **Willetts.P; Wood J. (1999).** “Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement”, Michael Thompson, Stephen Ellison, Ales Fajgelj; Pure & Applied Chemistry, 71(2):337-348.

Sites internet:

- www.ac-nancy-metz.fr
- www.adneurope.com
- www.deltalabo.fr
- www.ich.org
- www.media4.obspm.fr
- www.vam.org



Annexes

Annexe I

I. Etude de la linéarité :

1. Détermination de la droite de régression linéaire :

L'équation de la droite :

$$y = ax + b$$

- les valeurs de (a) et (b) sont déterminés par les relations suivantes :

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

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

Avec :

a : la pente

b : ordonnée à l'origine

x_i : concentration

y_i : surface

\bar{y} : la moyenne des surfaces

\bar{x} : la moyenne des concentrations

- formule de coefficient de corrélation est donné par la relation suivante:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2\right)\left(\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2\right)}}$$

AnnexeII

2. Comparaison à l'ordonnée à l'origine :

Test de student (t) :

$H_0: u = 0$ contre $H_1: u \neq 0$ au risque d'erreurs α

➤ La formule :

$$t = \frac{|b|}{S_b}$$

Avec :

b : l'ordonné à l'origine

$S_{(b)}$: écartype de la variable de l'ordonné a l'origine

3. Test d'homogénéité des variances :

Test de Cochran:

Il consiste à comparer le critère de Cochran de ces variances avec celui lu sur la table correspondante à un risque α .

La formule :

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p S_i^2}$$

Avec :

S_{\max}^2 : l'ecartype maximal de l'ensemble des variances calculé

S_i^2 : Variance calculée à partir de n résultats d'un même groupe i

Annexe III

4. Test d'existence d'une pente significative :

Test de Fisher :

Ce test consiste à comparer deux variances "variance intra-groupes" avec un ddl = nombre total - 2 et "variance inter-groupes" un ddl = nombre de répétition - 2 .

➤ *Formule de la variation intragroupe :*

$$S_{intra} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - m_j)^2$$

$$V_{INTRA} = S_{INTRA} / (N - 2)$$

Avec :

x_{ij} : i^{ème} valeur dans le j^{ème} groupe

n_j : effectif du j^{ème} groupe

m_j : moyenne du j^{ème} groupe

j : le nombre de colonne

➤ *Formule de la variation intergroupe :*

$$S_{inter} = \sum n_j (m_j - M)^2$$

$$V_{INTRA} = S_{INTRA} / (K - 2)$$

Avec :

M : la moyenne générale

J : le nombre de colonne

La formule du test :

$$F = \frac{V_{inter}}{V_{intra}}$$

Annexe IV

5. Test de validité de la droite de régression :

Test de Fisher :

Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement avec $ddl = \text{nombre d'essais} - 2$ du aux facteurs discriminants par exemple (l'analyste, le jour...) et les erreurs expérimentales avec un $ddl = \text{nombre totale d'essai} - \text{le nombre d'essais}$

$$F = \frac{\text{erreur de la régression}}{\text{erreur expérimentale}}$$

2. Etude de la fidélité :

➤ *Le coefficient de variation (cv) :*

le (cv) est l'écartype exprimé comme un pourcentage de la moyenne

$$cv = 100 \times \frac{\delta}{x}$$

δ : écartype

x : la moyenne

➤ Formule du dosage :

$$D = Pm(t) \times \frac{S(a)}{S(s)}$$

Avec :

$Pm(t)$: prise d'essai du témoin

$S(a)$: surface de l'essai

$S(s)$: surface du témoin

3. Etude de l'exactitude :

➤ *Le recouvrement :*

$$\% = \frac{\text{surface essai} \times \text{prise d'essai du témoin}}{\text{surface témoin} \times \text{prise d'essai de l'essai}}$$

Annexe V

4 . Répétabilité :

La concentration en saccharose exprimée en g/ 100ml dans le sirop est donnée par la formule suivante :

$$C = \frac{(a-a') \times 100 \times 100 \times d}{66.5 \times \text{pesé} \times 2}$$

Avec :

Soit « a » la déviation lue, exprimée en degrés

Soit « a' » la déviation lue correspondant à un blanc préparé sans saccharose dans les mêmes conditions .

66.5°= pouvoir rotatoire du saccharose

d = densité du sirop

Annexe VI



Figure 12 : HPLC



Figure 13 : Polarimètre

Résumé :

L'analyse, quantitative et qualitative, tend toujours, et de plus en plus vers de nouvelles méthodes et techniques dans un souci de gain de temps, de gains d'argent et de gain de précision. L'adoption d'une nouvelle technique ou son adaptation à un nouveau domaine d'application nécessite sa mise à l'épreuve, qu'elle soit validée

L'utilisation de la HPLC comme technique de dosages des parabènes (POBM sodique et POBP sodique) comme conservateurs dans le Maxilase et de la polarimétrie dans le dosage du saccharose dans le Rhinathiol ont été testées pour les critères suivant : Exactitude, Linéarité, Fidélité, Stabilité, Répétabilité dans le cadre d'une validation interne au laboratoire.

Les deux techniques se sont montrées valide pour les utilisations définies et en conformité parfaite avec les critères de validation définis par *l'ICH 2005 Q2_R*.

Mots Clés : Contrôle de qualité, Médicament, Validation, Exactitude, Linéarité, Fidélité, Stabilité, Répétabilité, Tests statistiques.

Abstract :

The analysis quantitative and qualitative, which always tends increasingly to new methods and techniques in order to save time, money gains and gain accuracy. The adoption of a new technology or adapting to a new application domain requires its testing, it is validated

Using the HPLC technique dosages as parabens (POBM sodium and POBP sodium) as preservatives in the Maxilase and polarimetry in the determination of sucrose in Rhinathiol were tested for the following criteria: Accuracy, linearity, precision, stability, and repeatability within the laboratory an internal validation.

Both techniques have proved valid for defined uses and in full compliance with the validation criteria defined by the ICH Q2_R 2005.

Keywords : Quality Control, Medicine, Validation, Accuracy, Linearity, Precision, Stability, Repeatability, Statistical tests.