République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

MEMOIRE DE MASTER

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Génie des Procédés

Option: Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE D'UN SIROP «XIMALEX»

Proposé et dirigé par :

Pr. O.BENKORTBI
Mr. F. ZOUAMBIA

Présenté par :

ZERROUATI Ilham
BENAYAD Malak

Année Universitaire 2022-2023

Remerciements

Nous commençons par remercier Allah tout puissant de nous avoir donné la Volonté, l'amour du savoir et surtout le courage et la patience pour effectuer ce modeste travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à

Mr.BEN KORTBI Othmane, Professeur à l'université de Médea et Mr. ZOUAMBIA Fouad Chef de service contrôle de qualité, SAIDAL , Médéa d'avoir accepté de nous encadrer, ainsi que pour leurs soutien, leurs remarques pertinentes et leurs encouragements.

Nous remercions également les membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à notre travail en acceptant de l'examiner et de le juger.

Enfin, Nous remercions tous les membres de nos familles ainsi que toutes nos amies et toute la promotion (2022 /2023).

Du fond du cœur, merci à tous.

Merci

Dédicace

À mes très chers parents et mes deuxièmes parents
Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grâce à votre amour, à votre patience et vos innombrables sacrifices.
Que ce modeste travail ' soit pour vous une petite compensation et reconnaissances envers ce que vous avez fait d'incroyables pour moi qu'ALLAH le tout puissant vous préserve et vous procure santé et longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler.
À mes très chers sœurs YOUSRA et HADIL et mon très cher frère ABDELLAH je vous aime.
À ma très cher tante je vous aime.
À mon très chère binôme ILHAM, je vous souhaite un grand succès dans votre vie.
À ma très chère amie Hanine .
En témoignage de l'amitié sincère qui nous a liées des bons moments passent ensemble.
Je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir radieux et plein de bonne promesse.

MALAK

Dédicaces

Tout d'abord je tiens à remercier ALLAH le tout puissant de
m'avoir donné la santé, la volonté et le courage.
J'ai l'honneur et le plaisir de dédier le fruit de mon travail aux
perles de ma vie, à qui j'exprime ma grande gratitude pour leurs
éducations, et leurs patiences
Les plus chères au monde ma chère mère et mon cher père, sources
de mes joies, secrets de ma force. Vous serez toujours le modèle.
Papa, dans ta force et ton honnête, Maman dans ta patience et ton dévouement pour nous,
Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants grandissent et prospèrent
Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie au bien être de vos enfants,
Merci d'être tout simplement mes parents,
C'est à vous que je dois cette réussite et je suis fière de vous l'offrir.
À Mon chère et unique frère ZINOU merci du fond du cœur pour
ta présence, ton amour et ton soutien dans les moments où j'en
avais le plus besoin, qu'ALLAH te garde et te protège.
À mes grandes sœurs OUM KELTHOUM et WAFAA qu'ALLAH les protègent.
À tous les membres de ma famille.
À mon très chère binôme MALAK , merci beaucoup pour ta
présence, sans ton aide, ce travail n'aurait jamais pu être accompli.
À Tous mes amis sans exception.
A tous ceux qui m'ont encouragé de près ou de loin.
ILHAM

ملخص

كزيمالكس هو دواء مضاد للالتهابات موصى به لعلاج التهاب الحلق. في هذا السياق ، ركز هذا العمل على تطوير والتحقق من طريقة اختبار Xymalex باستخدام ملف تعريف الدقة كأداة قرار التحقق من الصحة. تم إجراء معايير المعايرة والتحقق من الصحة عند خمسة مستويات تركيز: 0.8 و 0.94 و 1.00 و 1.1 و 1.2٪. من تحليل المعايير ، تم حساب الدقة والدقة وكذلك الخطأ الكلي في النماذج الرياضية المختلفة التي تم إنشاؤها لإنشاء ملف تعريف الدقة. تم اختبار العديد من نماذج الانحدار الخطي. النتائج التي تم الحصول عليها بالنموذج المختار 100 = y٪ أظهرت معاملات التباين 15> CV٪ ، التحيز النسبي <15٪ ونسبة الاسترداد 100٪ ، مما يؤكد موثوقية ودقة الطريقة. يحدد ملف تعريف الدقة فاصلًا كميًا تكون فيه الطريقة صالحة وقابلة للتطبيق بشكل روتيني.

الكلمات الرئيسية :كزيمالكس ، التحقق من الصحة ، الأشعة فوق البنفسجية المرئية ، الفحص ، ملف تعريف الدقة.

Résumé

Le Ximalex est un anti inflamatoire préconisé pour le traitement des maux de gorge. Dans ce cadre, le présent travail s'est focalisé sur la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du Xymalex par utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision de validation. Les standards d'étalonnage et de validation ont été effectués sur cinq niveaux de concentration : 0,8, 0,94, 1,00, 1,1 et 1,2%. A partir de l'analyse des standards, la fidélité, la justesse, ainsi que l'erreur totale avec les différents modèles mathématiques générés ont été calculés pour construire le profil d'exactitude. Plusieurs modèles de régression linéaire ont été testés. Les résultats obtenus avec le modèle choisi y= 100% ont montré des coefficients de variation CV < 15 %, un biais relatif < 15% et un pourcentage de recouvrement de 100%, ce qui permet de confirmer la fidélité et la justesse de la méthode. Le profil d'exactitude définie un intervalle de quantification pour lequel la méthode est valide et applicable en routine.

Mots clés : Ximalex, Validation, UV-Visible, Dosage, Profil d'exactitude.

Abstract

Ximalex is an anti-inflammatory drug recommended for the treatment of sore throats. In this context, this work has focused on the development and validation of a Xymalex assay method using the accuracy profile as a validation decision tool. Calibration and validation standards were performed at five concentration levels: 0.8, 0.94, 1.00, 1.1 and 1.2%. From the analysis of the standards, the fidelity, the accuracy, as well as the total error with the different mathematical models generated were

calculated to build the accuracy profile. Several linear regression models were tested. The results obtained with the chosen model y= 100% showed CV coefficients of variation < 15%, a relative bias < 15% and a recovery percentage of 100%, which confirms the reliability and accuracy of the method. The accuracy profile defines a quantification interval for which the method is valid and routinely applicable.

Keywords: Ximalex, Validation, UV-Visible, Assay, Accuracy profile.

SOMMAIRE

Introduction Générale……1

Chapitre I : Généralités sur Les médicaments……2

I.1. DEFINITION……..2

I.2. DENOMINATION……2

I.3. COMPOSITION D'UN MEDICAMENT……2

I.3.1 Principe actif…….....2

I.3.2 l'origine de principe actif……..3

I.3.3. Excipient……4

I.4. LES DIFFERENTS TYPES DE MEDICAMENTS……..5

I.4.1. Médicament princeps……...5

I.4.2. Médicament générique……5

I.4.3. La différence entre le princeps et le générique……..5

I.5. LES FORMES PHARMACEUTIQUES DES MEDICAMENTS…….6

I.5.1. Les formes solides……6

I.5.2. Les formes semi- solides (pâteuses)…….....7

I.5.3. Les formes liquides……...8

I.6. PROCEDE DE FABRICATION D'UN SIROP……11

I.6.1. Formulation des sirops……...12

I.6.2. Ordonnancement…….....12

I.6.3. La production……...……...12

Chapitre II : Médicaments de formes liquides……14

II.1. LES MEDICAMENTS DE FORMES LIQUIDES……14

II.1.1. Avantages et inconvénients……..14

II.2. α-AMYLASE…….....15

II.2.1. Introduction…….....…..15

II.2.2. Nomenclature…….....15

II.2.3. Description…….....15

II.2.4. Formule développée…….....15

II.2.5. Structure…….....16

II.2.6. Caractéristiques et propriétés des amylases…….....16

II.2.7. Origines de l'alpha-amylase…….....17

II.2.8. Mécanisme d'action……..…….....17

II.2.9. Applications industrielles……...…….....17

II.2.10. Sirop reconstitué à base d'alpha-amylase…….....……....18

II.3. SIROP XIMALEX ……..……....……19

II.3. 1. Définition……...…….....……19

II.3. 2. Préparation……...…….....…….....….19

II.3. 3. Procédés de préparation……...…….....19

II.3.4. Altération et conservation……...…….....20

II.3.5. Avantages et inconvénients……...…….....20

II.3.6. Présentation du sirop.....21

II.3.7. Posologie et mode d'administration.....22

II.3. 8. Conservation.....22

II.3. 9. Composition.....22

Chapitre III: Validation des méthodes d'analyses.....23

III.1.INTRODUCTION.....23

III.2. OBJECTIF.....24

III.3. ECHANTILLONS À ANALYSER.....24

III.4. VOCABULAIRES ET DEFINITIONS.....24

III.5. CRITÈRES DE VALIDATION.....29

III.5.1. Spécificité / Sélectivité.....29

III.5.2. Calcul des critères de validation.....29

III.5.3. Interpréter le profil d'exactitude pour la validation.....40

III.5.4. Linéarité.....40

III.5.5.Critères de validation complémentaires.....41

III.5.6. Limite de détection.....43

Chapitre IV: Procédure Expérimentale.....44

IV.1. INTRODUCTION.....44

IV.2. FICHE TECHNIQUE DU PRODUIT.....44

IV.3. MATERIEL ET REACTIFS.....44

IV.3.1. Réactifs.....44

IV.3.2. MATERIEL.....45

IV.4. METHODE DE PREPARATION.....47

IV.4.1. Procédure d'analyse.....47

IV.4.2. Mode opératoire.....47

IV.5.VALIDATION DE LA PROCEDURE D'ANALYSE.....48

IV.5.1. Spécificité.....49

IV.5.2. Plan d'expérience.....49

IV.5.3. Fonction de réponse.....52

IV.5.4. Alignement des observations.....52

IV.5.5. Prédiction inverse.....52

IV.5.6. Justesse et fidélité.....52

IV.5.7. Intervalle de tolérance.....52

IV.5.8. Profil d'exactitude.....52

IV.6. ANALYSES EFFECTUEES SUR LE SIROP XIMALEX 52

IV.6.1. Aspect.....52

IV.6.2. Densité.....52

IV.6.3. pH.....52

IV.6.4. Dosage de l'Alpha amylase par l'UV-Vis.....52

Chapitre V : Résultats et discussion.....55

V.1. ANALYSES EFFECTUEES SUR LE SIROP XIMALEX.....55

V.1.1. Aspect.....55

V.1.2. pH.....55

V.1.3. Volume moy.....55

V.1.4. Densité.....55

V.1.5. Dosage du principe actif (alpha amylase) par UV-VIS.....55

V.2. DONNEES BRUTES « STANDARDS D'ETALONNAGE ».....55

V.2.1. Fonction de réponse.....57

V.3. DONNEES BRUTES « STANDARDS DE VALIDATION ».....61

V.3.1. Fonction de réponse.....63

V.3.2. Prédiction inverse.....63

V.3.3. Estimation de la justesse et de la fidélité.....64

V.3.4. Estimation de l'exactitude.....66

V.3.5. Intervalle de tolérance.....67

V.3.6. Linéarité.....69

V.3.7. Limites de quantification.....70

Conclusion Générale.....77

Chapitre IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....78

Liste des figures

Figure II.1 : Structure tridimensionnelle de l'α amylase.....15

Figure II.2 : Structure d'alpha amylase.....16

Figure III.1 : illustration du mode de calcul de la limite de quantification.....42

Figure IV.1 : Balance analytique.....46

Figure IV.2 : PH-mètre.....46

Figure IV.3 : Spectrophotomètre UV-VIS.....46

Figure IV.4 : Agitateur à ultra-son.....46

Figure IV.5 : Agitateur électromagnétique à plaque chauffante.....46

Figure IV.6: Agitateur vortex.....46

Figure 5 : Schéma de principe du spectromètre UV-Visible monofaiseau.....53

Figure V.1: Courbes d'étalonnage du Ximalex obtenues avec la fonction y =ax+ b 58

Figure V.2 : Courbe d'étalonnage du Ximalex pour la fonction y =ax.....59

Figure V.3 : Courbe d'étalonnage du Ximalex pour la gamme 100%.....60

Figure V.4: profil d'exactitude de biais pour le Ximalex pour ʎ= ± 5% et β=90%.....68

Figure V.5: profil d'exactitude de concentration pour le Ximalex pour λ=±5% etß=90%.....69

Figure V.6: Droites linéaires entre les concentrations prédites en fonction des concentrations.....70

Liste des tableaux

Tableau I.1: Les avantages et les inconvénients des sirops.....**11**

Tableau II.1: Différentes applications des alpha-amylases.....**18**

Tableau II.2. Altération des sirops.....**20**

Tableau III.1 : vocabulaires et definitions.....**24**

Tableau III.2 : Organisation des mesures du plan de validation préparé à partir de l'analyte à doser.....**32**

Tableau III.3 : principales fonctions de réponse utilisables pour un étalonnage.....**35**

Tableau III.4 : équations de prédiction inverse selon le type de la fonction de réponse.....**36**

Tableau III.5: concentrations retrouvées par prédiction inverse obtenues à partir des dodu plan de validation.....**37**

Tableau III.5: critères de fidélité et de justesse par niveau.....**38**

Tableau IV.1 : Sirop XIMALEX 20 000 U CEIP/100ML Suspensuion buvable.....**44**

Tableau IV.2: Propriétés physicochimiques et précaution d'emploi des réactifs.....**45**

Tableau IV.3: Appareils utilisés **45**

Tableau V.1: Données brutes des standards d'étalonnages.....**56**

Tableau V.2 : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Ximalex avec la fonction : y = ax +b.....**58**

Tableau V.3 : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Ximalex : y = ax+b.....**59**

Tableau V.4 : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Ximalex avec la fonction : y = ax..**59**

Tableau V.5 : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Ximalex pour la gamme 100%.....**60**

Tableau V.5 : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Ximalex pour la gamme 100%.....61

Tableau V.6: Données brutes des standards de validation.....61

Tableau V.7 : Paramètres de validation obtenus pour le Ximalex pour la gamme 100%.....63

tableau V.8.....64

Tableau V.9 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour le Ximalex.....65

Tableau V.7 : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour le Ximalex.....65

Tableau V.12 : Profil d'exactitude obtenu pour le Ximalex.....66

Tableau V. 13 : Limites de tolérance du Ximalex.....67

Tableau V. 14 : Limites de tolérance du Ximalex.....68

Tableau V.15 : Concentrations prédites en fonction des concentrations introduites pour les trois séries.....69
Tableau V.16 : Calcul des limites de quantification.....71

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BPL : Bonnes pratiques de laboratoire

CV : Coefficients de variation

DCI : Dénomination commune internationale

DO : Densité optique

GBEA : Guide de bonne exécution des analyses

IR : Infrarouge

ISO: International standard organization

LNCPP : Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques

LQ : Limite de quantification

PA : Principe actif.

PE : Plan d'Étalonnage

pH : Potentiel hydrotimétrique

PV : Plan de Validation

R^2 : Le coefficient de détermination

SACI : International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics

SE : Standards d'étalonnage

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SV : Standards de validation

UV : Ultraviolet

VIM : Vocabulaire International de Métrologie

UCEIP : Une unité CEIP correspond à la quantité d'enzyme mg qui catalyse l'hydrolyse de 1 mg d'amidon en 10 seconde dans les conditions du dosage

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

L'industrie pharmaceutique se doit, d'un point de vue à la fois éthique, réglementaire et commercial, de produire et de mettre sur le marché des médicaments possédant un haut degré de qualité, cette obligation éthique que possède l'industrie envers les utilisateurs l'oblige à mettre en place un système d'assurance de la qualité à tous les niveaux de l'entreprise : du développement a la libération du médicament [1].

La qualité des médicaments est un des majeurs soucis des professionnels des services de santé et des patients, elle se définit par la maîtrise d'ensemble de paramètres et propriétés qui permettent d'assurer la sécurité des patients, et amener le médicament à un niveau d'exigences satisfaisant. Afin d'atteindre cette qualité, il faut évaluer tous les risques susceptibles à la détérioration du médicament et qui affectent la santé du patient.

Les médicaments risquent des altérations à différents niveaux de la chaine de fabrication. Elles peuvent être d'ordre physico-chimique, ou microbiologique, d'où le producteur doit suivre tout le procès de fabrication et les étapes de contrôle qualité au sein des laboratoires [2]. L'industrie pharmaceutique est, dans le monde entier, un élément important des systèmes de santé. Elle comprend de nombreux services et entreprises, publics ou privés, qui découvrent, mettent au point, fabriquent et commercialisent des médicaments au service de la santé humaine et animale [2].

Les pays en développement, à l'instar de l'Algérie, l'industrie pharmaceutique est une branche particulièrement sensible de l'économie. Elle connait actuellement de profondes évolutions. En donnant naissance à plusieurs firmes pharmaceutiques dont le groupe SAIDAL. Ce dernier est considéré comme premier fabricant sur le marché algérien par ses médicaments de différentes formes pharmaceutiques (solide, semi-solide et liquide)[2].

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était de suivre les différentes étapes de fabrication d'un sirop à usage humain «XIMALEX», avec les tests de contrôle de qualité physico-chimique et microbiologique qui assure la conformité de ce produit [1].

Ce mémoire est composé de deux parties: la première c'est une revue bibliographique qui comprend trois chapitres, le premier représente des généralités sur les médicaments. Le deuxième chapitre, décrit les médicaments de forme liquides. Le troisième chapitre, est consacré à l'étude des méthodes de validation des médicaments.

Quant à la deuxième partie expérimentale, elle est subdivisée en deux parties. La première consiste à décrire la procédure expérimentale et la deuxième comprend l'interprétation des résultats trouvés. Le travail se termine par une conclusion générale qui regroupe tous les résultats et trace les perspectives qui pourront être envisagées dans le future.

Chapitre I : GENERALITES SUR LES MEDICAMENTS

GENERALITES SUR LES MEDICAMENTS

I.1. DEFINITION

Un médicament est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animale, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer corriger ou modifier leurs fonctions organiques en exerçant une action pharmacologique, ou métabolique [1].

Le médicament générique est une copie du médicament princeps, développé et commercialisé par le premier laboratoire après l'épuration de l'exclusivité de commercialisation par les premiers laboratoires qui l'ont découvert. Comme tout médicament conforme a l'egélation, le générique ne peut être commercialisé sans avoir obtenue une AMM [2].

I.2. DENOMINATION

Chaque médicament possède au moins trois noms [3] :

- Nom chimique
- Dénomination commune internationale « D C I »
- Nom de spécialité ou nom de marque

I.3. COMPOSITION D'UN MEDICAMENT

Un médicament est une composition d'une molécule biologiquement active dite « principe actif » avec d'autres substances appelées « excipients » qui permettent l'obtention de sa forme finale, diffusion dans l'organisme et sa conservation [2].

I.3.1 Principe actif

Le principe actif est une substance active douée de propriété pharmacologique qui confère au médicament son activité thérapeutique. Elle est l'origine biologique minérale ou organique, extrait de la nature ou bien synthétique. Le principe actif agit sur la structure ou les fonctions de l'organisme humain ou animal par des moyens pharmacologique, un médicament peut contenir un ou plusieurs principes actifs « substance actif » [3].

I.3.2 l'origine de principe actif

Les principes actifs sources de nouveaux médicaments tirent leur origine du monde minéral, végétal ou animal. Ils peuvent aussi être obtenus par voie synthétique, biologique ou biotechnologique [4].

1 .Origine minérale

On trouve essentiellement les éléments suivants :

potassium, sodium, chlore, calcium,magnésium, fer, fluor, iode, sels d'or,…

Des sels minéraux sont également répertoriés à savoir :

- bicarbonate de sodium (correcteur de pH pour l'acidité gastrique),
- silicate d'aluminium et de magnésium (pansement gastro-intestinal),
- sulfates de sodium et de magnésium (purgatifs),
- oxyde dezinc (antiseptique), … [4].

2. Origine végétale

Les principes actifs d'origine végétale composent ce qu'on appelle la phytothérapie. Cette discipline utilise les plantes entières, une partie de celles-ci ou encore des drogues obtenues par extraction et purification .Comme substances actives extraites de plantes et exploitées dans l'arsenal thérapeutiques de l'homme, nous citons : les alcaloïdes, les glycosides cardiotoniques, les cyanogèniques, les flavonoïdes, les minéraux, les phénols, les polysaccharides, les saponines, les tanins, les vitamines, les huiles essentielles [5].

3. Origine animale

C'est une thérapie ancienne, utilisée pour traiter des insuffisances physiologiques.

Exemple : les enzymes pancréatiques (lipase, protéase, amylase), les Facteurs VIII ou IX, les gonadotrophines chorioniques, l'héparine, l'hormone de croissance, l'insuline humaine ou de porc, les gammaglobulines spécifiques [6].

4. Origine microbiologique

Ce sont des produits élaborés par des microorganismes cultivés en milieu liquide (levures, bactérie, virus).

Exemples : la pénicilline, la ciclosporine, les vaccins, …[6].

5. Origine synthétique

Les substances actives d'origine synthétique sont très nombreuses. Elles sont obtenues soit par hémisynthèse, soit par synthèse chimique .

A. Hémisynthèse

Un produit existant est modifié afin d'améliorer ses performances thérapeutiques à savoir :

• Absorption accrue par l'organisme ;

• Réduction des effets secondaires nocifs ;

• Modification de la lipophile pour favoriser le passage transmembranaire ;

• Modification d'une interaction chimique avec un agent pathogène.

Exemple : les pénicillines ont toutes un noyau bêta-lactame.

Des modifications chimiques ont été apportées sur ce noyau, donnant des pénicillines plus efficaces.

B. Synthèse chimique

Il peut s'agir de la synthèse d'un analogue structural, d'un agent bloquant des récepteurs spécifiques ou d'un inhibiteur enzymatique.

Exemple : Antibiotique antibactérien isolé d'un jus de fermentation de micro-organisme et fabriqué par synthèse totale.

6. Origine biotechnologique

Les microorganismes sont cultivés pour produire des protéines recombinantes identiques à celle produite par l'homme. Il s'agit de l'insuline, l'hormone de croissance, l'interféron, [7,8].

I.3.3. Excipient

Le mot excipient : du latin « exciper » qui signifie recevoir et donc l'excipient reçoit le principe actif. L'excipient est une substance d'origine chimique ou naturelle qui facilitent l'utilisation du médicament mais ne présentent pas d'effet curatif ou préventif.

La fonction d'un excipient est de servir un vecteur aux principe(s) actif(s) ou d'entrer dans la composition de vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés de produits telles que la stabilité, le profile biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication [9].

A. Origine

Les excipients sont d'origine soit, naturelle, soit synthétique ou semi synthétique.

-Excipients d'origine minérale.

- Excipients minéraux liquides et semi solides.

- Excipients minéraux solides.

-Excipients d'origine organique [10].

B. Rôle

Son rôle est de faciliter l'administration des principes actifs, d'améliorer leur efficacité, et d'assurer la stabilité et la conservation du médicament.

• Le but de l'excipient est de transporter le médicament jusqu'au lieu d'absorption par l'organisme et sa propriété principale était l'inertie vis à vis du principe actif, vis à vis de l'organisme et vis à vis du conditionnement.

• L'excipient participe également de plus en plus à une meilleure biodisponibilité du principe actif par contre ses effets notoires [11,12]

I.4. LES DIFFERENTS TYPES DE MEDICAMENTS

On distingue deux types de médicaments ; le princeps, et le générique.

I.4.1. Médicament princeps

Le produit pharmaceutique original, est celui qui a fait l'objet d'un brevet tombé dans le domaine public, appelé également spécialité, princeps, ou encore référence [13].

I.4.2. Médicament générique

Le Code de la Santé Publique (Art. L.521-1) définit le médicament générique comme une spécialité « qui a la même composition qualitative et quantitative en principe actif, la même forme pharmaceutique, et dont la bioéquivalence avec la spécialité de référence est démontrée par des études de biodisponibilité appropriées... » [14].

I.4.3. La différence entre le princeps et le générique

La principale différence qui existe entre les médicaments génériques et les princeps est d'ordre budgétaire. En effet, les princeps coûtent plus cher car, pour les mettre au point, des recherches, des études et des essais cliniques extrêmement onéreux ont dû être mis en place. Inversement, les médicaments génériques sont bien meilleur marché car après 10 à 15 ans

d'exploitation du princeps par un laboratoire, le brevet devient public. Les autres laboratoires peuvent donc à leur tour le produire sous forme de médicament générique et ainsi faire jouer la concurrence afin de baisser les prix. Cela faire des économies aux patients et aux organismes de santé publique [15].

I.5. LES FORMES PHARMACEUTIQUES DES MEDICAMENTS

On appelle « formes pharmaceutiques » ou « formes galéniques », les présentations pratiques des médicaments qui permettent leur administration. La nature de ces formes dépend de la voie d'administration possible ou choisie, mais plusieurs formes sont utilisables par la même voie. Un principe actif (un médicament) peut être présenté sous diverses formes [16].

I.5.1. Les formes solides

A. Les comprimés

Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'un ou plusieurs principes actifs. Ils ont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules . Les formes pharmaceutiques la plus répandue :

- Comprimés non enrobés.
- Comprimés effervescents.
- Comprimés solubles ou dispersibles.
- Comprimés enrobés.
- Comprimés gastorésistants.
- Comprimés à libération modifiée.
- Comprimés à utiliser dans la cavité buccale.

B. Les capsules

Sont des préparations solides constituées d'une enveloppe dure ou molle, de forme et de capacité variables, contenant généralement une dose unitaire de principe actif. Les capsules sont le plus souvent destinées à l'administration par voie orale.Plusieurs catégories de capsules peuvent être distinguées [17]:

- les capsules à enveloppe dure ou gélules.
- Les capsules à enveloppe molle.
- Les capsules gastrorésistantes.
- Les capsules à libération modifiée.

• Les cachets.

C. Les poudres

Les poudres sont des préparations constituées par des particules solides, libres, sèches et plus ou moins fines. Elles contiennent un ou plusieurs principes actifs additionnés ou non de substances auxiliaires et si nécessaire de matières colorantes autorisées et d'aromatisants [17].

I.5.2. Les formes semi- solides (pâteuses)

Ce sont des préparations de consistance semi- solide ou pâteuse destinées à être appliquées sur la peau ou certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou transdermique [12].

A. POMMADES

Les pommades se composent d'une base monophasique dans laquelle peuvent être dispersées des substances liquides ou solides. On distingue :

A.1. Les pommades hydrophobes

Les pommades hydrophobes (lipophiles) ne peuvent absorber normalement que de petites quantités d'eau. Les substances les plus communément employées pour la formulation de telles pommades sont la vaseline, la paraffine, la paraffine liquide, les huiles végétales ou les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides.

A.2. Les pommade absorbant l'eau

Ces pommades peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau. Leurs excipients sont ceux d'une pommade hydrophobe dans lesquels sont incorporés des émulsifiants du type eau-dans-huile tels que la graisse de laine, des alcools de graisse de laine, des esters de sorbitanne, des monoglycérides, des alcools gras.

A.3. Les pommades hydrophiles

Les pommades hydrophiles sont des préparations dont les excipients sont miscibles à l'eau. Ces derniers sont constitués habituellement par des mélanges de polyéthylèneglycols (macrogols) liquides et solides. Ils peuvent contenir des quantités appropriées d'eau [12].

B. CREMES

Les crèmes sont des préparations multiphasiques composées d'une phase lipophile et d'une phase aqueuse. On distingue :

B.1. Les crèmes hydrophobes

Dans les crèmes hydrophobes, la phase externe est la phase lipophile. Ces préparations contiennent des agents émulsifiants eau-dans huile tels que la graisse de laine, des esters de sorbitanne, des mono glycérides.

B.2. Les crèmes hydrophiles

Dans les crèmes hydrophiles, la phase externe est une phase aqueuse. Ces préparations contiennent des agents émulsifiants huile dans l'eau tels que des avons de sodium ou de triéthanolamine, des alcools gras sulfatés, des polysorbates en combinaison éventuellement avec des agents émulsifiants eau-dans-huile [12].

I.5.3. Les formes liquides

Les formes pharmaceutiques liquides pour usage orale sont habituellement des solutions, émulsions ou suspensions contenant un ou plusieurs principes actifs dans un véhicule approprié. Les liquides pour usage orale sont le plus souvent édulcorés et destinés à être avalés. On distingue d'une part celles qui sont préparés à l'avance, et celles qui sont préparés au moment de l'emploi, d'autre part celles qui sont délivrées en dose unitaires (formes divisées), et celles qui le sont en récipients multi doses (formes à diviser, en gouttes ou cuillères).

Elles sont conditionnées en récipients multi doses ou uni doses, et peuvent contenir des conservateurs anti microbiens appropriés, des anti- oxygènes et d'autre substances auxiliaires telles que, des substances épaississantes, des aromatisants, des édulcorants, et des matières colorantes autorisées [17].

I.5.3.1. Les avantages et les inconvénients des formes liquides

A. Les avantages

✓ Plus facile à avaler que les comprimés ou les gélules ;

✓ Adapté aux enfants

✓ Le principe actif est plus rapidement libéré que dans le cas des formes solides car les liquides n'ont pas besoin de se déliter ou de se dissoudre ;

✓ Leur couleur, odeur et goût rend les formes liquides plus acceptable par les malades (enfants).

B. Les inconvénients

▪ Les préparations liquides sont des préparations nécessitant un conditionnement encombrant et souvent fragile et lourd ;

▪ Elle nécessite l'utilisation de conservateurs pour éviter la prolifération de microorganismes;

▪ Certaine préparation ne peut être conservé que pour une courte durée [17].

C. Les différentes formes liquides

1. Les solutions pour usage oral

Ce sont des préparations liquides homogènes, obtenus par dissolution d'une ou plusieurs substances médicamenteuses dans un solvant approprié. On distingue :

Les formes multi doses : Présentées en flacon : dans ce cas sont réalisés à l'aide :

*D'une cuillère à café, à dessert ou à soupe ;

*D'un compte goutte : pour les solutions administrées en petites quantités

*Seringue graduée en nombre de gouttes ou en ml : pour les médicaments très actifs.

Les formes unitaires : présentées en ampoules buvables.

2. Les émulsions buvables

Ce sont des préparations constituées par deux liquides non miscibles, l'un étant dispersé dans l'autre. Ces préparations sont aromatisées et édulcorées ce qui rend leur administration plus agréable que celle des huiles prises en nature ex : émulsion buvable d'huile de foie de morue.

3. Les gouttes buvables

Ce sont des solutions, des émulsions ou des suspensions administrées en petits volumes au moyen d'un dispositif approprié.

4. Les suspensions buvables

Elles sont utilisées pour la voie orale soit parce que le principe actif ne peut être dissous dans l'eau, soit parce qu'un dérivé insoluble est préféré pour sa saveur moins désagréable. Une agitation au moment de l'emploi est nécessaire pour homogénéiser le contenu du flacon avant le prélèvement. La suspension doit alors être suffisamment stable pour que toutes les cuillerées prélevées contiennent la même quantité de principe actif [18].

5. Les sirops

Selon la pharmacopée européenne, un sirop « est une forme galénique liquide qui contient au moins un principe actif administré par voie orale ». Les sirops sont des préparations aqueuses sucrées et de consistance visqueuse. Ils sont généralement préparés avec du saccharose, à une concentration voisine de 65 %. Ce n'est qu'à partir de la concentration de 45 % qu'une solution de saccharose est appelée sirop.

Les sirops peuvent contenir un ou plusieurs principes actifs et aussi des substances auxiliaires telles que colorants, aromatisants et agents antimicrobiens. Pour la conservation, il est conseillé de mettre les sirops en flacons bien bouchés dans des endroits frais [19].

5.1. Historique

Les sirops de produits naturels, leur origine remonte à l'histoire de la Grèce Antique et de celle de Rome. À cette époque, les produits biologiques frais étaient conservés au miel de façon à ce que les boissons aromatisées aux produits naturels puissent être préparées une fois la saison passée. Au XVIIème siècle, Vatel, le cuisinier de Louis XIV, a prouvé que le sucre nous permettait de conserver la fidélité des produits biologiques au temps, tout en respectant la sincérité du goût.

C'est au XVIIIème siècle que l'on peut lire pour la première fois « sirop » en anglais, en texte qui évoque le sirop utilisé en pharmacie et en cuisine. À l'époque, il a été utilisé pour des fleurs et des plantes comme la camomille, la rose ou bien pour la reprise du sureau. Ce n'est qu'en 28 juillet 1908, que le terme « sirop » apparaisse pour la première fois dans un texte réglementaire [20].

5.2. Composition du sirop

Les sirops peuvent contenir un ou plusieurs principes actifs et des substances auxiliaires (colorant, aromatisants, agents antimicrobien). Le nom et la concentration des édulcorants et des polyols doivent être indiqués sur l'étiquette .

5.2.1. Conservateurs anti microbienne

Les conservateurs sont ajoutés dans le cas des préparations qui n'ont pas elle-même des propriétés antimicrobiennes suffisantes pour se protéger de la prolifération de microorganismes.

5.2.2. Les colorants

Les colorants sont des entités chimiques bien définies [21] ; ils permettent d'augmenter l'acceptabilité et l'attirance esthétique de la formulation.

5.2.3. Les aromatisants

Les aromes sont, dans le domaine pharmaceutique des substances destinés à être introduites dans certains médicaments pour en masquer ou améliorer la saveur ou l'odeur.

5.2.4. Les avantages et les inconvénients des sirops

Tableau I.1: Les avantages et les inconvénients des sirops [22].

Avantages	Inconvénients
Formes multidoses homogènes	Altération rapide, car ils sont en solution
Concentration déterminée	Conditionnement particulier qui peut être encombrant, lourd et fragile.
Principes actifs mieux tolérés (en raison de leur dilution), mieux absorbés et actifs plus rapidement	Précision et exactitude de la dose administrée dépendent du patient.
Saveur agréable et bonne acceptabilité, en particulier par les enfants**.**	Déconseillé pour les patients diabétiques.

I.6. PROCEDE DE FABRICATION D'UN SIROP

La fabrication du sirop à usage médical est le plus souvent réalisée sur des lignes de production pharmaceutique automatisée. Les sirops sont préparés à base d'eau et d'une petite quantité de principe actif à choisi en fonction de l'infection ou de la maladie à traiter. Des excipients sont ensuite ajoutés, parfois complétés par des arômes et des colorants.

La fabrication de sirop comprend également l'étape de conditionnement, qui permet de conduire le produit d'un état semi fini (vrac) à un état comme produit fini administrable par le patient [23].

I.6.1. Formulation des sirops

La formulation consiste à fabriquer des produits homogènes stables et possédants des propriétés spécifiques, en mélangeant différentes matières premières, sous une forme pharmaceutique définie. Avant la formulation d'un sirop il est nécessaire de:

• Définir les caractéristiques physico-chimiques des matières premières,

• Définir les consignes de sécurités à prendre lors de la manipulation des produits [24].

I.6.2. Ordonnancement

C'est une structure fondamentale de la production, responsable de la préparation et la mise en place d'une feuille de route, pour le démarrage des opérations (production) par apport au programme émanant de la direction générale qui se résument par les taches suivantes:

• Réception du programme annuel.

• fragmenter et planifier le programme annuel.

• Dispatching du plan de production à toutes les interfaces.

• Exprimer les besoins en MP par rapport à l'objectif et au programme tracé à cet effet.

I.6.3. La production

I.6.3.1. La pesée

Etape critique de la fabrication, d'où l'exigence au minimum d'un double contrôle. C'est une opération pharmaceutique qui représente les quantités et doses de matières premières nécessaires pesées dans un local spécifique répondant à la norme de pesage (humidité, température, étalonnage et qualification, tenue vestimentaire règlementaire……

Objectif de la cabine de pesée: le poste de pesée assure pendant les phases de manipulations, la protection collective des opérateurs et de l'environnement.

I.6.3.2. La formulation (préparation du mélange)

La formulation est une opération qui consiste à préparer une solution aqueuse sirop composée d'eau, principe actif et excipients dans deux cuves différentes se déroulant en plusieurs étapes à savoir :

- Mélanger l'eau et le sucre dans la première cuve (sirop simple).

- Préparation de la solution active (excipient + principe actif) dans la deuxième cuve moins volumineuse.

- Mélanger les deux solutions dans la première cuve.

- Intervention du C.I.P pour conformité [20].

I.6.3.3. La filtration

C’est une opération pharmaceutique consiste à séparer, au moyen d'un filtre, des particules solides ou liquides , Le mélange est transférer de la cuve de préparation vers la cuve de stockage en le filtrant sur une chambre filtrante de porosité déterminé [20].

I.6.3..4. Le remplissage

C’est une opération pharmaceutique qui consiste à remplir la solution (sirop) de la cuve vers les flacons par un robinet qui s’ouvre et ferme d’une manière automatique selon la quantité qu’on a besoin. Remplissage des flacons à l'aide de becs doseurs Sertissage des flacons avec des bouchons.

I.6.3.5. Le conditionnement

De manière globale, le conditionnement équivaut à l’emballage d’un produit en général. Le conditionnement appliqué au médicament se définit comme :

1) Ensemble des opérations (y compris le remplissage et l’étiquetage) que doit subir un produit en vrac ou une forme galénique avant de devenir un produit fini, le plus souvent, une spécialité pharmaceutique fabriqué industriellement.

2) Ensemble des éléments assurant la présentation d’un médicament terminé avant sa remise au public à l’exclusion de l’emballage prévu pour le transport et l’expédition.

3) Ensemble des éléments matériels destinés à protéger le médicament tout au long de son parcours [20].

I.6.3.6. Le stockage et entreposage

Après avoir terminé toutes les étapes de la fabrication et du conditionnement, le produit va être transféré au niveau de la zone d’instance d’analyse ce même produit est soumis a un contrôle de qualité en interne (laboratoire de contrôle et de la qualité) cela après avoir subi plusieurs contrôles in procès au cours de sa fabrication , par la suite il subira le dernier test d’analyses du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCPP) pour valider la conformité de ce dernier d’où l’autorisation de sa commercialisation [24].

Chapitre II : MEDICAMENTS DE FORMES LIQUIDES

MEDICAMENTS

DE FORMES LIQUIDES

II.1. LES MEDICAMENTS DE FORMES LIQUIDES

Les préparations des médicaments liquides pour usage oral sont habituellement des solutions, émulsions ou suspensions contenant un ou plusieurs principes actifs dans un véhicule approprié. Les liquides pour usage oral sont destinés à être avalés. Ils peuvent également être préparés avant l'emploi, à partir de préparations liquides concentrées, de poudres ou de granulés en utilisant un véhicule approprié.

Les liquides pour usage oral sont conditionnés en récipients multi doses ou uni doses. Ils sont administrés soit en volumes (par exemple une cuillère de 5 ml), soit en petits volumes (gouttes). Chaque dose d'une préparation multi dose est administrée à l'aide d'un dispositif permettant de mesurer la quantité prescrite. Les liquides pour usage oral peuvent contenir des conservateurs antimicrobiens appropriés, des antis oxygènes et d'autres substances auxiliaires telles que, des substances épaississantes, des aromatisants, des édulcorants et des matières colorantes autorisées [25].

II.1.1. Avantages et inconvénients

II.1.1.1. Avantages

- Plus facile à avaler que les comprimés ou les gélules, ce sont des Préparation qui conviennent particulièrement aux enfants et aux adultes ayant du mal à avaler ;
- L'action thérapeutique des formes liquides est plus rapide que les formes solides ;
- Leur couleur, odeur et gout rend les formes liquides plus acceptable par les malades (enfants) ;

II.1.1.2. Inconvénients

- Les préparations liquides sont des préparations nécessitant un conditionnement encombrant, souvent fragile et lourd ;
- Elle nécessite l'utilisation de conservateurs pour éviter la prolifération de microorganismes ;
- Certaine préparation ne peuvent être conservé que pour une courte durée ;

II.2. α-AMYLASE

II.2.1. Introduction

L'α-amylase comme toutes enzymes, est une macromolécule qui fait partie de la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon. L'α-amylase et les protéases sont les plus utilisés en bio-industrie (SACI., 2012). Par ailleurs, la part du marché mondial prise par les enzymes est de 59% pour les protéases et 28% pour les glucanases dont 13% pour l'alpha-amylase [26].

II.2.2. Nomenclature

- **Nom codifié :** EC 3.2.1.1
- **Nom commun :** α -amylase
- **D'autres nom (s):** glycogénase, α-amylase; endoamylase; Taka-amylase A, maxilase..
- **Nom systématique:** 1,4 – alpha -D-glucane,4 glucano hydrolase.
- **Synonymes**: glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A.

II.2.3. Description

- Aspect physique : liquide limpide de couleur brunâtre

II.2.4. Formule développée

La figure présente un schéma simplifié du alpha amylase :

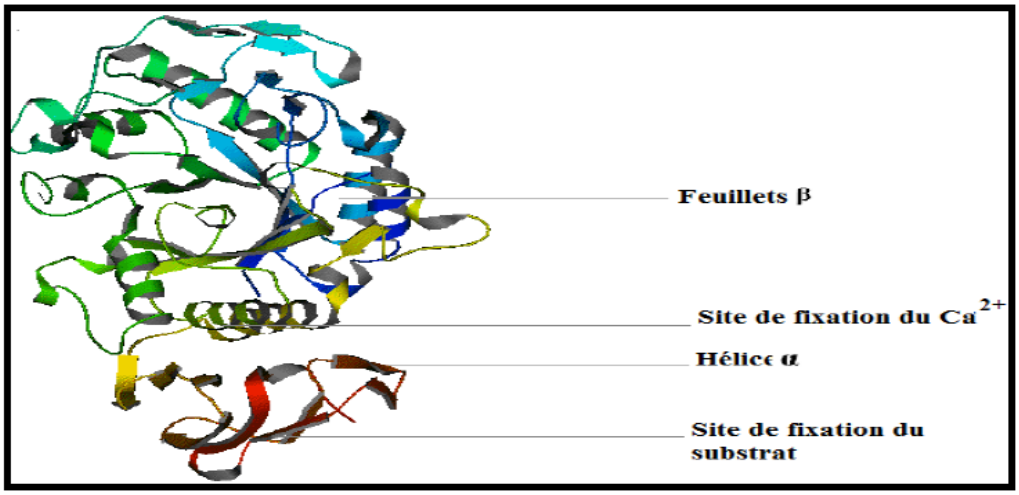


Figure II.1. Structure tridimensionnelle de l'α amylase [27].

II.2.5. Structure

Les α-amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381-478 résidus) [28]. Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes. La partie glucidique est formée essentiellement de mannose, les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l' α-amylase est formée de 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α .

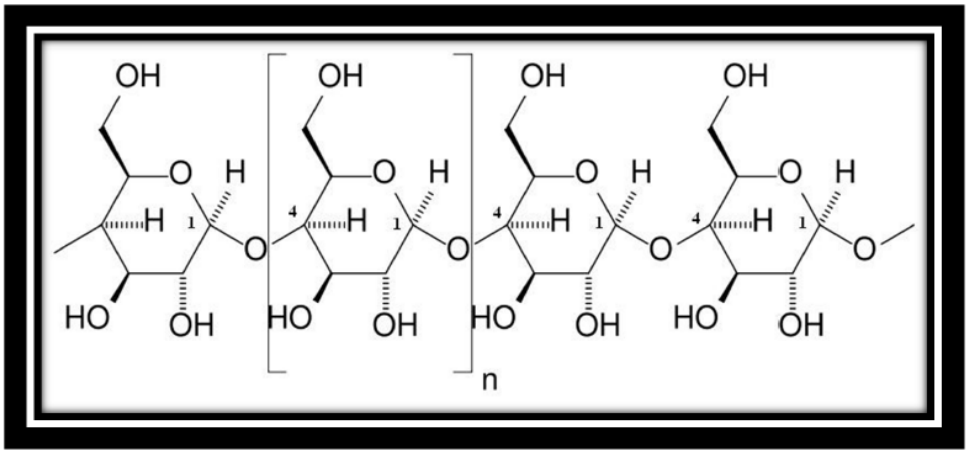


Figure II.2. Structure d'alpha amylase

II.2.6. Caractéristiques et propriétés des amylases

Plusieurs équipes ont caractérisés et travaillés sur les propriétés physicochimiques des amylases [29]. Parmi ces propriétés on a :

➢ **Poids moléculaire** : Le poids moléculaire des amylases varie selon l'origine des espèces.

➢ **Température optimum** : Selon l'origine et les espèces, les alphas amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C.

➢ **pH optimum** : L'alpha -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme. L'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8.

➢ **Spécificité du substrat** : Le substrat naturel de L'alpha -amylase est l'amidon dont les unités de glucose sont reliées par des liaisons osidiques.

II.2.7. Origines de l'alpha-amylase

Les alpha-amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles peuvent être extrait à partir des tissus végétaux, d'animaux ou par fermentation des cellules microbiennes [28].

➢ **L'origine animale** : Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères.

➢ **L'origine végétale**: Les L'alpha-amylases végétales présentent une importance dans le métabolisme glucidique. Elles sont impliquées dans la conversion de l'amidon en sucres réducteurs.

II.2.8. Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif. La réaction catalytique est réalisée en trois étapes :

➢ Protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur de proton Glu 261 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par ASP 231 et le départ de l'extrémité réductrice du substrat.

➢ Activation d'une molécule d'eau, vrai semblablement par le maintien du Glu 261 déprotonné.

➢ Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l ASP 231 et le C1 de résidu du sucre en position 1.

II.2.9. Applications industrielles

La commercialisation des alpha-amylases est la plus ancienne, ils sont parmi les hydrolases les plus importantes pour les industries amidonneries. La première utilisation en 1984 comme aide pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs [30].

Actuellement, les α- amylases sont largement appliquées dans tous les processus industriels, et surtout avec les α-amylases microbiennes. Ces derniers, ont bien remplacé, les catalyseurs chimiques dans les industries de transformation d'amidon, mais également dans les industries chimiques pharmaceutiques et autres.

Tableau II.1: Différentes applications des alpha-amylases

Industries	Applications
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon ; accompagné d'une importante de la viscosité (liquéfaction).
Sucrerie	Réduction de la viscosité des sirops de canne a sucre, en hydrolysant les contaminants amylacé pour assuré le processus de cristallisation.
Biscuiterie et panification	Amélioration des propriétés, rhéologique et fermentaires de la pate ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croute.
Industrie textile	Désencollage textile ; qui permet d'éliminer la colle de l'amidon qui enduits les fibres et le protèges au cours du tissage.
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon pour préparer la sauce de couchage permettant d'éliminer les irréguliers superficiels de la feuille.
détergent	Dégradation des taches a base d'amidon, les oligosaccharides et les dextrines libérés de l(action hydrolytiques sont soluble. Ce qu'il facilité le découpage physique de la tache.
Industrie pharmaceutique	Traitement de diabète et de l'obésité.

II.2.10. Sirop reconstitué à base d'alpha-amylase

Les sirops sont des préparations aqueuses caractérisées par leur saveur sucrée et leur consistance visqueuse. Ils peuvent contenir du saccharose à une concentration au moins égale à 45 pourcent m/m . A une concentration voisine de 65% en masse (une densité de l'ordre de 1,32 à 20°C), le saccharose assure une protection antimicrobienne. Ce médicament contient une enzyme destinée à lutter contre l'oedème et l'inflammation. Il est utilisé dans le traitement d'appoint de l'inflammation aiguë de la gorge. Ce traitement se prend par voie orale, conçus généralement pour les enfants à partir de six mois.

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

- **Principe actif :** alpha-amylase, c'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires de type endoglycanases, de la classe des hydrolases, qui agit sur les liaisons α (1-4) de l'amidon.
- **Excipients :** Saccharose, Parahydroxybenzoate de méthyle sodé (E219), parahydroxybenzoate de propyle sodé (E217) (Conservateurs antimicrobiens), Agent colorant azoïque (jaune orangé) (E110) (Colorants) le glycérol, huile essentielle soluble de mandarine et l'acide citrique monohydraté (aromatisants) [30]

II.3. SIROP XIMALEX

II.3. 1. Définition

Les sirops sont des préparations aqueuses contenant une forte proportion de sucres ce qui leur donne leur consistance et assure leur conservation sous certaines conditions. La forte proportion de sucre a pour rôle de masquer la saveur désagréable des principes actifs et d'assurer la conservation [31].

II.3. 2. Préparation

Ils sont préparés généralement avec du sucre qui a une concentration minimale de 45% m/m ; à une concentration voisine de 65% m/m (densité de l'ordre de 1.32 à 20 °C), le Saccharose l'assure, sous certaines conditions, une protection anti microbienne. Lorsqu'il est porté à ébullition, le sucre subit une décomposition ou interversion. Le saccharose se décompose en glucose et lévulose. La lumière, la présence d'acidité, la pulvérisation peuvent également entrainer la décomposition du saccharose [31].

II.3. 3. Procédés de préparation

II.3. 3. 1. Dissolution à chaud

La dissolution est facile et rapide ; obtenue par chauffage : en remuant de temps à autre : le sirop prend une discrète coloration jaunâtre et contient de petite quantité de sucre invertie. Industriellement ; la dissolution est obtenue très rapidement par le passage de vapeur d'eau sous légère pression dans des cuves de grande contenance renferment le sucre à dissoudre. Cette dissolution entraine toujours une légère altération .

II.3.3.2. Dissolution à froid

Elle est préférable car elle évite tous risque d'altération du sucre par la chaleur ; mais elle

est difficile et lent. Elle est réalisée par contacte prolongé du solvant avec le sucre ; dans un récipient en agitant sans cesse. Elle peut s'effectuer de façon continue dans un appareil spécial (Saccharolyseur).

II.3.3.3. Cuisson des sirops

Elle consiste à chauffer le sirop dans un matériel convenable ; pour faciliter l'évaporation d'eau en excès tous en surveillant la densité. Cette cuisson à pour but d'amener le sirop à la densité exactement désirée. Après dissolution du sucre d'une part et de concentrer convenablement le sirop trés dilué d'autre part [31].

II.3.3.4. Classification du sirop

Cette méthode permet de rendre le sirop limpide en éliminant les impuretés. La pharmacopée préconise une classification avec de la pate à papier pour la méthode à chaude. Du blanc d'œuf pour celle à froid ; le sirop et l'albumine sont chauffés ; la coagulation du blanc d'œuf emprisonne les impuretés ; puis il y a une filtration [32].

II.3.4. Altération et conservation

Il est conseillé de mettre les sirops dans des flacons hermétiques dans des endroits frais malgré leur forte concentration en sucre ; ils se conservent plus en moin bien. L'altération peut être du à une très faible ou trop forte concentration de sucre.

Tableau II.2. Altération des sirops

Cristallisation	Fermentation
Quand le sirop est trop concentré en saccharose, il faut ajouter de l'eau pour réajuster la densité	Quand le sirop est trop dilué, il se conserve mal, il permet la prolifération des levures et moisissures. Il peut se produire une fermentation alcoolique

II.3.5. Avantages et inconvénients

II.3.5.1. Avantage

- Bonne absorption de certains principes actifs au niveau de la muqueuse buccale.
- Forme multi- dose homogène.
- Concentration déterminée.
- Divisible avec une précision suffisante.

- ❖ Principe actif mieux tolérés (en raison de leur dilution), mieux absorbés et actifs plus rapidement [33]

II.3.5.2. Inconvénients

- Maintien du produit dans la bouche pendant l'absorption.
- Déglutition avec la salive.
- Altération plus rapide car en solution.

II.3.6. Présentation du sirop

A. Classe pharmaco thérapeutique

Un sirop contenant une enzyme a effet anti inflammatoire

B. Forme et présentation

Sirop à 200 U CEIP/mL, des flacons de 125 mL, 100 ml et 200 mL.

C. Indication thérapeutique

Ce médicament est indiqué dans les maux de gorge peu intenses est en cas de traitement d'appoint des états congestifs de l'oropharynx, Manifestation inflammatoire et hyper sécrétoire des voies respiratoires chez l'adulte et l'enfant, Bronchites, pneumopathies aigues, Manifestation respiratoire des maladies infectieuses.

D. Contre indication

Allergie a alpha amylase ou l'un des composants de sirop.

E. Effets indésirables

Quelque très rare éruption de type urticaire. En raison de présence d'alpha-amylase et de jaune orangé (E110) rare réaction d'allure allergique, généralement cutané, en particulier urticaire et oedème

F. Précaution d'emploi

En cas d'apparition d'autres symptômes (maux de gorge importants, céphalées, nausées, vomissement ….) ou de fièvre associe, la conduite à tenir doit être réévalué. Ce médicament ne doit pas être utilisé de façon prolongée sans avis médicale.

II.3.7. Posologie et mode d'administration

A. Posologie

Adulte : 1 cuillère a soupe (15 ml), 3 fois par jour.

Enfant entre 3 et 12 ans (15 kg) :1 cuillère a dessert (10 ml), 3 fois par jour.

Nourrisson et enfant de 6 mois a 3 ans (7 kg a 15 kg) : 1 cuillère a café (5 mL, 3 fois par jou.r

B. Mode d'administration

Voie orale, a utiliser selon prescription médicale

II.3. 8. Conservation

A conserver a une température inferieure a + 25C° et a l'abri de la lumière et de la chaleur

II.3. 9. Composition

Le ximalex renferme un seul principe actif [30] :

Matières premières	Fonction
Alpha amylase	Principe actif
Saccharose (excipient)	Agent sucrant
Glycérol	Conservateur
Parahydroxy benzoate de methyle (excipient)	Conservateur
Parahydroxy benzoatedepropyle (excipent)	Conservateur
Colorant jaune FCF(E110)	Agent colorants
Eau purifiée (excipient)	Solvant
Arome de mandarine	Aromatisant, masqué le gout

Chapitre III : VALIDATION DES METHODES D'ANALYSES

VALIDATION DES METHODES D'ANALYSES

III.1.INTRODUCTION

Parmi les diverses préoccupations des analystes, la place prise par la validation des méthodes, doit être mise en relation avec le développement de l'assurance qualité dans les laboratoires. Les principes de l'assurance qualité sont l'objet d'une série de normes publiées par l'International Standardisation Organisation (ISO), comme la série des normes ISO 9000. S'y trouvent définies la qualité et toutes les opérations qui y concourent.

Même si ces normes ne sont pas, en général, applicables en l'état aux activités des laboratoires, leur lecture n'est pas inutile. Elles insistent sur le fait que la qualité des produits ou des services doit être conçue en vue de satisfaire les besoins d'un client. Souvent on résume les objectifs de la qualité d'un produit ou d'un service sous la forme d'une liste comme celle-ci :

- répondre à un besoin, un usage ou un objectif bien défini ;
- satisfaire les attentes des consommateurs ;
- être conforme aux normes, spécifications, exigences réglementaires et autres ;
- avoir à un prix compétitif ;
- être fourni à un coût qui génère un profit.

Par ailleurs, pour remplir son rôle, un système d'assurance de la qualité doit présenter trois caractéristiques :

- être conçu pour le but qu'on lui assigne ;
- être correctement mis en œuvre ;
- être effectivement contrôlé.

Tous ces principes peuvent sembler bien abstraits mais en les appliquant à l'activité d'un laboratoire d'analyse, l'assurance de la qualité est tout ce qui peut individuellement ou collectivement influencer le résultat d'une analyse. Afin de prendre en compte la spécificité des activités de laboratoire et la diversité de leurs domaines d'application, il existe au moins quatre référentiels principaux qui expliquent comment organiser l'assurance de la qualité au laboratoire:

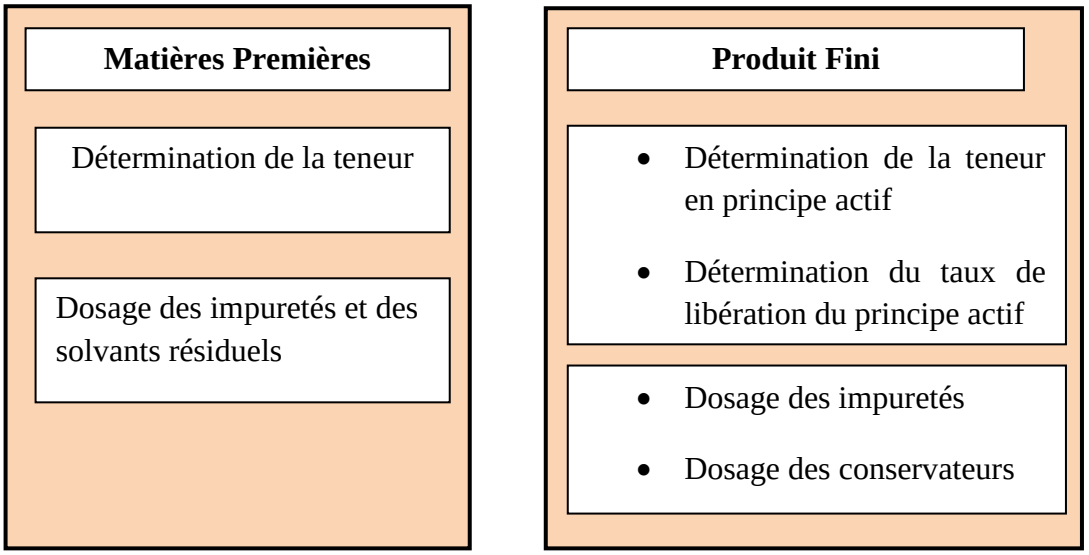
1. les Bonnes pratiques de laboratoire (BPL)
2. le Guide de bonne exécution des analyses (GBEA)
3. l'accréditation
4. la certification de service

III.2. OBJECTIF

Il est nécessaire de prouver qu'avec la procédure analytique mise au point on peut quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. A cet effet, l'objectif de la validation est de :

- ❖ démontrer que la procédure analytique est appropriée à l'usage auquel elle est prévue,
- ❖ prouver aux autorités compétentes que la différence entre le résultat obtenu et la vraie valeur inconnue est inférieure à une limite d'acceptation.

III.3. ECHANTILLONS À ANALYSER



III.4. VOCABULAIRES ET DEFINITIONS

Le vocabulaire relatif à la validation est très abondant, souvent confus. Nous avons décidé de choisir les définitions proposées en 2007 dans la dernière version du vocabulaire International de Métrologie (VIM) (Guide ISO/CEI 99:2007) et SFSTP 2009 car elles représentent l'effort le plus récent de normalisation dans ce domaine.

Tableau III.1 : vocabulaires et definitions

Terme	Référence	Définition
Mesurage, mesure	VIM 2.1	Processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à une grandeur.
Mesurande	VIM 2.3	Grandeur que l'on veut mesurer. Analyte employé en chimie, est un synonyme de mesure d'usage plus général.

Justesse de mesure, justesse	VIM 2.15	Étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.
Fidélité de mesure, fidélité	VIM 2.16	Étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées.
Condition de répétabilité	VIM 2.21	Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure opératoire, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps.
Répétabilité de mesure, répétabilité	VIM 2.22	Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité.
Condition de fidélité intermédiaire	VIM 2.23	Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure opératoire, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier.
Fidélité intermédiaire de mesure, fidélité intermédiaire	VIM 2.24	Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de fidélité intermédiaire
Exactitude de mesure, exactitude	VIM 2.13 et 2.14	Paramètre qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesure à partir des informations utilisées. L'incertitude de mesure comprend des composantes provenant d'effets systématiques, telles que les composantes associées aux corrections et aux valeurs assignées des étalons, ainsi que l'incertitude définitionnelle. Parfois, les effets systématiques connus ne sont pas corrigés mais traités comme des composantes de l'incertitude. Le paramètre qui sert à exprimer l'incertitude peut être, par exemple, un écart-type appelé incertitude-type (ou un de ses multiples) ou la demi étendue d'un Intervalle ayant un niveau de confiance déterminé.

Limite de détection	VIM 2.27	Valeur mesurée, obtenue par une procédure opératoire donnée, pour laquelle la probabilité de déclarer faussement l'absence d'un constituant dans un matériau est β, étant donnée la probabilité α de déclarer faussement sa présence. La notation β utilisée dans cette définition représente un risque d'erreur (dit de seconde espèce) et ne doit pas être confondue avec la proportion β de la définition de l'intervalle de tolérance.
Sélectivité	VIM 4.13	Aptitude d'un système de mesure, utilisant une procédure opératoire spécifiée, à fournir des résultats de mesure pour un ou plusieurs mesurant des, qui ne dépendent pas les uns des autres ou de toute autre grandeur existant dans le système en cours de mesurage.
Spécificité	VIM 4.13	Stade ultime de la sélectivité.
Valeur de référence	VIM 5.18	Valeur d'une grandeur, dont l'incertitude de mesure associée est considérée communément comme suffisamment petite pour que la valeur puisse servir de base de comparaison pour les valeurs de grandeurs de même nature.
Validation	VIM 2.45	Vérification que des exigences spécifiées sont adéquates pour un usage déterminé. Le terme caractérisation s'applique à la méthode, alors que le terme vérification s'applique au résultat rendu. La validation de la méthode consiste donc à vérifier si les résultats sont adéquats en vue d'un usage défini.
Vérification	VIM 2.44	Fourniture de preuves tangibles qu'une entité donnée satisfait à des exigences spécifiées, en prenant en compte toute incertitude de mesure
Domaine d'application de la méthode>	SFSTP	Ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode, en tenant compte de la gamme de concentrations sur laquelle doit porter la validation.
Domaine de validation	SFSTP	Ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode et gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation.
Domaine de validité	SFSTP	Ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode et gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation et pour lequel les futurs résultats fournis par la méthode sont jugés valides.

Méthode quantitative	SFSTP	Méthode d'analyse qui détermine la quantité ou la fraction pondérale d'un analyte de manière à pouvoir l'exprimer sous forme de valeur numérique dans les unités appropriées.
Méthode de référence	SFSTP	Méthode d'analyse reconnue par des experts ou prise comme référence par accord entre les parties, qui donne ou est supposée donner la valeur de référence acceptée.
Matrice	SFSTP	Ensemble des propriétés de l'échantillon et de ses constituants autres que l'analyte. L'effet de matrice traduit l'influence possible que ces propriétés ou constituants peuvent avoir sur la réponse instrumentale. Comme l'effet de matrice peut varier aux différents stades de l'analyse (par exemple avant ou après minéralisation), pratiquement un type de matrice sera défini comme un groupe de matériaux ou de produits reconnus par l'analyste comme ayant un comportement homogène vis-à-vis de la méthode d'analyse utilisée.
Série	SFSTP	Ensemble de mesurages réalisés sur un même échantillon selon des conditions de connues. Par exemple, une série réunira des mesurages effectués un même jour et/ou par un même opérateur et/ou un même appareil…
Profil d'exactitude	SFSTP	Combinaison, sous une forme graphique, d'un ou plusieurs intervalles de tolérance d'espérance calculés à différents niveaux de concentration et d'une ou plusieurs intervalles d'acceptabilité.
Intervalle de tolérance d'espérance β (Intervalle de tolérance)	SFSTP	Intervalle qui contient en moyenne une proportion β% définie de futurs mesurages obtenus selon un mode opératoire donné et pour une concentration donnée. NOTE. L'intervalle de tolérance, revêt une grande importance dans la suite du texte. Ses limites sont obtenues par le calcul, à partir de mesurages répétés. La valeur de β est, généralement, choisie entre 80 % et 95 %. En fait, elle n'intervient que pour situer la limite de quantification de la méthode.
Intervalle d'acceptabilité	SFSTP	Spécification de la performance exigée pour la méthode, exprimée comme un écart acceptable autour de la valeur de référence. Les limites de l'intervalle sont fixées par le

		client ou par une obligation réglementaire, parfois en fonction du niveau de concentration. Elles sont notées ± λ en valeurs absolues et dans l'unité du mesurande ou (1 ± λ) □□100 en valeurs relatives.
Échantillon de validation (échantillon témoin)	SFSTP	Matériau dont la valeur de référence peut être assignée, soit parce qu'il s'agit d'un matériau de référence (certifié ou non), soit parce qu'on a procédé à un ajout dosé ou un marquage de la molécule à doser.
Limite de quantification (1)	SFSTP	Plus petite et/ou plus grande concentration de l'analyte pouvant être quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.
Limite de quantification (2)	SFSTP	Plus petite et/ou plus grande quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. Elle correspond à la concentration la plus petite et/ou la plus grande du domaine de validité.
Linéarité de la méthode	SFSTP	Établissement qu'il existe une relation linéaire entre les quantités retrouvées (ou quantifiées) dans des échantillons et leurs valeurs de référence. La linéarité de la méthode ne doit pas être confondue avec la linéarité de la fonction de réponse de l'appareillage de mesure qui caractérise la seule réponse instrumentale lors de l'étalonnage et qui n'est pas indispensable pour obtenir une quantification exacte.

III.5. CRITÈRES DE VALIDATION

- ❖ Spécificité / Sélectivité
- ❖ Intervalle de dosage
- ❖ Fonction de réponse
- ❖ Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaires)
- ❖ Justesse
- ❖ Exactitude
- ❖ Profil d'exactitude
- ❖ Linéarité

❖ Critères de validation complémentaire

III.5.1. Spécificité / Sélectivité

- Préparer une forme reconstituée qui est composée de tous les constituants à l'exception de l'analyte à doser.
- Préparer une solution à partir de la forme reconstituée.
- Préparer une solution standard.

Effectuer le contrôle des deux solutions préparées dans les mêmes conditions.

III.5.2. Calcul des critères de validation

III.5.2. 1. Définir la quantité mesurée

À partir du mode opératoire de la méthode, on définit la quantité mesurée en précisant les formules d'expression du résultat final et la procédure pour établir ce résultat. En particulier, il faut faire la distinction entre deux types de méthodes.

- Les méthodes « indirectes ou rationnelles » qui exigent un étalonnage préalable pour calculer la concentration des échantillons inconnus. Pour ces méthodes, on procède en deux étapes : d'abord construire la courbe d'étalonnage (fonction de repose) en utilisant le même principe physico-chimique que celui qui sert pour les échantillons ; ensuite faire des mesures sur les échantillons inconnus et calculer leurs concentrations à l'aide d'un modèle d'étalonnage ;
- Les méthodes « directes ou empiriques » dont l'analyte est défini par la méthode elle-même.

On mesure alors la concentration des échantillons inconnus à l'aide d'une autre méthode de mesure, comme une pesée ou une titrimétrie. Il est fondamental que la quantité mesurée lors de la validation soit bien la même que celle qui sera mesurée en routine. En particulier, si le mode opératoire prévoit d'exprimer le résultat final à partir d'un seul mesurage, il ne faut pas exprimer le résultat d'un essai de validation comme la moyenne de plusieurs répétitions.

III.5.2.2. Préciser les objectifs de la validation

- Domaine de validation : Le choix du domaine d'application peut correspondre à une obligation légale.

Dans le domaine pharmaceutique, il faut prendre en compte les domaines minimums suivants :

- pour les substances pures ou les spécialités pharmaceutiques, le domaine doit au moins couvrir entre 80 et 120 % de leurs valeur nominales ;

- pour une vérification de concentration continue, le domaine doit s'étendre entre 70 et 130 % de la concentration attendue.

III.5.2. 3. Sélectionner les échantillons de validation

A. Choisir la ou les matrices

Les essais qui servent à calculer les éléments du profil d'exactitude doivent être réalisés sur des échantillons clairement identifiés, appelés échantillons de validation. Ce sont des matériaux qui doivent être le plus représentatif possible du domaine d'application de la méthode. Ils peuvent ainsi inclure différentes matrices pour les méthodes multi-matrices. Mais surtout on doit être capable de leur attribuer une valeur de référence qui représente la teneur attendue. Penser à choisir des matériaux stables et homogènes en quantité suffisante pour réaliser l'ensemble des essais définis par le plan d'expérience de validation.

B. Établir les valeurs de référence des échantillons de validation

Pour estimer la justesse de la méthode, il faut disposer d'échantillons de validation dont la concentration est connue le plus exactement possible avec une incertitude connue. Cette concentration correspond à la valeur de référence assignée à l'échantillon de validation et doit être fixée indépendamment de la méthode à valider, on la note *X*. Il existe plusieurs approches possibles pour établir la valeur de référence assignée à un échantillon de validation,

C. Utiliser des matériaux de référence certifiés

La traçabilité de ces matériaux décroît en fonction de leur nature.

- ✓ réaliser des ajouts dosés à partir d'une molécule étalon de pureté connue.
- ✓ préparer des échantillons avec la matrice choisie.
- ✓ utiliser une méthode de référence, appliquée en interne ou en externe par un laboratoire pair.

Si la valeur de référence est estimée par des répétitions de la méthode de référence, il conviendra de sélectionner la valeur la plus représentative, comme la moyenne ou la médiane. Cette approche doit être préférentiellement appliquée dans le cas de la validation d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.

D. Utiliser de la dilution isotopique

Pour la préparation d'échantillons de validation par la méthode des ajouts dosés de niveaux variés, veiller à réduire le plus possible la dépendance entre les différentes préparations. Les ajouts dosés peuvent être effectués sous une forme liquide (par ajout d'une solution étalon) ou solide (par pesée). Si on procède par des dilutions successives (1/2, 1/4,

1/8…) à partir d'une même solution mère, on crée une corrélation entre les mesures et on augmente les conséquences d'une erreur de justesse ; il est donc déconseillé de procéder de cette façon.

Cette remarque s'applique aussi à la préparation des solutions étalons.

Le choix raisonné des valeurs de référence revêt un aspect fondamental pour l'application du profil d'exactitude car il conditionne la justesse de la méthode. En fonction de la technique analytique choisie, toute approche visant à cet objectif est acceptable, aussi longtemps qu'une justification scientifique fondée est apportée.

Lorsqu'on est dans l'incapacité d'assigner une valeur de référence à un échantillon de validation, il est possible de la remplacer par la moyenne ou la médiane des concentrations obtenues directement sur cet échantillon. La valeur de référence ainsi obtenue n'est plus indépendante de la méthode en cours de validation et interdit l'évaluation du biais de justesse.

Cette approche très restrictive doit être clairement justifiée dans le dossier de validation.

III.5.2. 4. Planifier les essais de validation

A. Organiser les essais de validation

Le plan d'expérience de validation sert à estimer, dans les conditions où le mode opératoire sera appliqué en routine, quelles seront les performances en routine de la méthode. Dans ce contexte, un essai consiste à faire un mesurage sur un échantillon de validation, de préférence dont la valeur de référence a été établie avec une incertitude connue. Les notations sont rappelées à la Partie 3. Pour réaliser ce plan, il faut prévoir :

– I séries de mesures ($1 \leq i \leq I$) ;

– pour chaque série, effectuer J répétitions ($1 \leq j \leq J$) ;

– K niveaux de concentration ($1 \leq k \leq K$) couvrant le domaine d'application de la méthode.

Dans ce contexte, on entend par un niveau une valeur de référence.

Construire un tableau qui rassemblera les données brutes selon le modèle du tableau III.1.

Les valeurs de référence X_K des échantillons de validation sont exprimées en quantités absolues

(mg, g,…) ou relatives (mg/mg, µmg/mg, mg/l,…). Pour les méthodes indirectes, la réponse Y est notée dans une unité correspondant à celle de la méthode instrumentale (surface du pic, hauteur de pic, absorbance,…). Pour les méthodes directes, elle est directement exprimée dans la même unité que celle des valeurs de référence.

Tableau III.2 : Organisation des mesures du plan de validation préparé à partir de l'analyte à doser

Niveaux	**Série (Jours)**	**Concentration introduite des échantillons de validation (valeurs de référence)** ***X***	**Réponses instrumentales** ***Y***			
			1	2	...	J
1	1	X_{11}	Y_{111}	Y_{121}	...	Y_{1J1}
	...	...				
	I					
2	1					
	...					
	I					
...	...					
K	1					
	...	...				
	I	X_{IK}			...	Y_{IJK}

Pour notre choix selon SFSTP deux plans d'expérience sont nécessaires :

- Plan d'Étalonnage « PE » : préparé à partir de l'analyte à doser, il sert à calculer la fonction de réponse d'une procédure d'analyse.

  30 solutions seront préparées : 05 niveaux de concentrations avec 02 répétitions, sur 03 séries (5×2×3).

- Plan de Validation « PV » : préparé à partir d'une forme reconstituée, servant à calculer les caractéristiques de la validation.

  45 solutions seront préparées : 05 niveaux de concentrations avec 03 répétitions, sur 03 séries (5×3×3).

III.4.2.5. Réaliser les essais

Il est impératif de réaliser les mesures pour le plan de validation en appliquant la méthode telle qu'elle sera utilisée en routine. En particulier, appliquer au mieux les conditions d'étalonnage même si celles-ci pourront être modifiées au vu des résultats obtenus par le profil d'exactitude. Par contre, le nombre de « répétitions » utilisées pour exprimer un résultat final doit être fidèlement respecté. Par exemple, si chaque résultat final est exprimé comme la moyenne de 2 répétitions, chaque essai doit être fait selon cette méthode.

Dans le cas où des effets de matrice ont été mis en évidence lors du développement de la méthode, on peut être amené à réaliser plusieurs plans de validation pour calculer un facteur de correction qui sera appliqué en routine (sauf interdiction réglementaire). Il faut alors effectuer deux plans de validation sur deux échantillons indépendants et utiliser les résultatsdu premier pour calculer le facteur de correction qui sera appliqué au second plan (Feinberg M., 2010c)

Le rôle du profil d'exactitude est d'estimer, à partir des résultats obtenus lors de la validation, quelle garantie aura l'utilisateur que la méthode utilisée en routine fournira des résultats acceptables. C'est pourquoi, la réalisation des plans doit respecter les conditions suivantes :

A. Exigences d'être en condition de fidélité intermédiaire

Les mesurages doivent être réalisés en condition de fidélité intermédiaire ou de reproductibilité, avec pour objectif de prendre en compte le plus de sources d'incertitude possible. Comme ces sources d'incertitude dépendent de la méthode et des matrices analysées, il est impossible de définir une stratégie unique. Il est recommandé de construire un diagramme causes/effets pour choisir les conditions les plus globales.

Dans la plupart des cas, on pourra décider de faire les mesurages sur plusieurs jours dans la mesure où on prend ainsi en compte les incertitudes dues à l'appareillage (réglages, et préparation des réactifs), à l'étalonnage, au personnel, à la conservation de l'échantillon… Mais pour des échantillons très instables, on pourra réaliser les mesurages sur un seul jour avec plusieurs opérateurs ou instruments.

B. Exigences de couvrir le domaine d'application

Une étude de validation doit couvrir l'ensemble du domaine d'application de la méthode. Pour satisfaire ces deux contraintes, plusieurs choix sont possibles et, dans tous les cas, avant de commencer il faut disposer de quantités suffisantes d'échantillons pour faire tous les mesurages :

- utiliser un seul échantillon dont on sait faire varier le niveau de concentration, par exemple au moyen d'ajouts dosés (approche de choix pour une méthode indirecte) ;
- utiliser plusieurs échantillons (ou même plusieurs matrices proches) présentant des niveaux de concentration variés (généralement le cas pour une méthode directe) ;
- préparer des matrices synthétiques (matières premières ou produits chimiques) ;
- utiliser des matériaux de référence externes ou certifiés…

C. Exigences de synchroniser les plans.

Dans le cas, où deux plans sont nécessaires –étalonnage et validation – il est indispensable de réaliser les essais dans les mêmes conditions de fidélité intermédiaire. Par exemple, si le jour est la source de variation choisie, il faut réaliser des mesurages d'étalonnage et de validation pour un même jour donné. Les données d'étalonnage de ce jour serviront à prédire les concentrations à partir des données de validation faites le même jour.

III.5.2.6. Calcul des concentrations prédites inverses

Avant tout traitement numérique, il est recommandé de procéder à une illustration graphique préalable et à un examen visuel des données afin de détecter une erreur flagrante, comme une donnée mal enregistrée. Ces graphiques peuvent être mis en annexe du dossier d'évaluation.

La présence d'une donnée anormale amène à suspecter une mauvaise mise au point de la méthode et peut invalider la procédure de validation.

A. Calcul des modèles d'étalonnage (fonctions de réponses)

Pour les méthodes directes, cette étape de calcul n'existe pas. Pour les méthodes indirectes, il est nécessaire d'exprimer la réponse instrumentale Y en fonction des concentrations introduites x des étalons, à l'aide d'un modèle mathématique f de la forme :

$Y = f(x)$ .Les fonctions f classiquement utilisées sont regroupées au tableau III.3 mais cette liste n'est pas limitative. Les paramètres $a1$, $a2$,… sont appelés les paramètres du modèle.

Calculer les paramètres du modèle d'étalonnage à partir des données recueillies pour chaque série k, de façon à obtenir k ensembles de valeurs des paramètres.

Le même type de modèle doit être utilisé pour l'ensemble des données, quelle que soit la série, mais les valeurs des paramètres peuvent être différentes d'une série à l'autre. Cette approche permet de prendre en compte les variations inter-séries (inter-jours) observées.

Le calcul des estimations des coefficients du modèle d'étalonnage peut faire appel aux diverses techniques statistiques classiques détaillées dans la littérature :

1. Régression par la méthode des moindres carrés
2. . Régression pondérée

3. Régression non linéaire

Tableau III.3 : principales fonctions de réponse utilisables pour un étalonnage

Type	**Équation**	**Souhaitable pour *K'***	**Minimum pour *K'***
Droite	$Y = a_0 + a_1 x$	2	1
Droite passant par l'origine	$Y = a_1 x$	3	2
Fonction quadratique	$Y = a_0 + a_1 x + a_2 x^2$	4	3
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = a_0 + \frac{a_3 - a_0}{1 + \left(\frac{a_2}{x}\right)^{a_1}}$	5	5

Trois modèles mathématiques sont choisis, à savoir :

- Droite linéaire
- Droite linéaire passant par l'origine :
- Droite linéaire passant par zéro et un point de la gamme qui est le 100% :

Pour chaque modèle mathématique, il est nécessaire de déterminer la pente, l'ordonnée à l'origine, le coefficient de détermination et l'erreur résiduelle. Le coefficient de détermination R^2 doit être supérieur à 0,99. Ce coefficient n'est pas une indication fiable sur la qualité des résultats obtenus par la procédure d'analyse.

NB :

Alignement des observations : Si les concentrations introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries, il faut alors les aligner sur une même concentration moyenne. L'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les standards de validation « SV » en utilisant la fonction de réponse testée avec les standards d'étalonnage « SE », comme suit

Réponse alignée = Réponse obtenue – Pente de la fonction de réponse × [Concentration théorique – Concentration introduite]

A. Calcul des concentrations retrouvées par prédiction inverse

Sur la base des réponses des « SV » et à partir de la fonction de réponse obtenue par les « SE », on calcul les concentrations calculées, comme suit:

$$z_{ijk,c} = \frac{y_{ijk} - \alpha}{\beta_i} \qquad \text{(III.1)}$$

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse et les valeurs *z* ainsi obtenues

Sont appelées concentrations retrouvées.

Tableau III.4 : équations de prédiction inverse selon le type de la fonction de réponse

Fonction de réponse	**Fonction inverse de calcul de la concentration retrouvée**
Droite	$z_{ijk,c} = \frac{y_{ijk} - a_0}{a_1}$
Droite passant par l'origine	$z_{ijk,c} = \frac{y_{ijk}}{a_1}$
Fonction quadratique	$z_{ijk,c} = \frac{-a_1 + \sqrt{a^2 - 4a_2(a_0 - Y_{IJK}}}{2a_2}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$z_{ijk} = \frac{a_2}{(\frac{a_3 - a_0}{y_{ijk} - a_0} - 1)^{1/a_1}}$

C. Calcul de la justesse par série

Rassembler l'ensemble des données dans un tableau selon le modèle du Tableau 6. Au cas où différents modèles d'étalonnage sont testés, construire autant de tableaux qu'il y a de

modèles. Utiliser les valeurs de z pour calculer les écarts-types de répétabilité, inter-séries et de fidélité intermédiaire (ou de reproductibilité). Ce calcul s'effectue indépendamment pour chaque niveau de concentration k (avec 1 ≤k ≤K) selon le principe de la norme ISO 5725-2, comme il est décrit dans Feinberg M. (2010c).

Tableau III.5: concentrations retrouvées par prédiction inverse obtenues à partir des données du plan de validation

Niveau	**Série**	**Répétition**	**Concentration théorique *x***	**Concentration retrouvée z**	**Biais absolu**	**Biais relatif**
1	1	1	x_{111}	Z_{111}	b_{111}	$b_{111}\%$
	1	2				
1						
K						
	I	J	x_{ijk}	z_{ijk}	b_{ijk}	$b_{ijk}\%$

Dans le tableau III.5, il est possible de calculer un ou plusieurs critères exprimant la justesse (Sous la forme d'un biais). Ces critères sont les suivants :

Biais absolu :

$$b_{ijk} = z_{ijk} - x_{ijk} \text{ .} \qquad \text{(III.2)}$$

Biais relatif :

$$b_{ijk}\% = \frac{z_{ijk} - x_{ijk}}{x_{ijk}} * 100. \quad \text{(III.3)}$$

Recouvrement :

$$R\% = \frac{z_{ijk}}{x_{ijk}} * 100\ . \quad \text{(III.4)}$$

A. Calculer la justesse et la fidélité par niveau

Rassembler avec les critères de justesse, calculés pour un niveau et non plus pour un mesurage individuel, sous la forme d'un tableau (tableau III.5).

Dans les cas très particuliers où la justesse n'est pas exigée, la valeur de référence moyenne peut être fixée comme étant égale à la concentration retrouvée moyenne. Il est alors inutile de calculer un biais moyen ou un taux de recouvrement moyen.

Tableau III.5: critères de fidélité et de justesse par niveau

Critères		**Niveaux**		
Valeur de référence moyenne	$\overline{x_k}$	**1**		**K**
Concentration retrouvée moyenne	$\overline{z_k}$			
Écart-type de répétabilité	S_{Kr}			
Écart-type inter-séries	S_{Kb}			
Écart-type de fidélité intermédiaire	$S_{KFI} = \sqrt{S_{Kr}^2 + S_{Kb}^2}$			
Coefficient de variation de la fidélité Intermédiaire en pourcentage	$CV\% = \frac{S_{KFI} * 100}{\overline{z_k}}$			
Biais moyen absolu	$b = \overline{z_k} - \overline{x_k}$			
Biais moyen relatif	$b\% = \frac{\overline{z_k} - \overline{x_k}}{\overline{x_k}} * 100$			
Taux de recouvrement moyen	$R\% = \frac{\overline{z_k}}{\overline{x_k}} * 100$			

B. Calcul des intervalles de tolérance

Le rôle de l'intervalle de tolérance et du profil d'exactitude est de pouvoir avoir l'assurance que lorsqu'on utilise cette méthode dans le futur (en routine), les résultats trouvés seront toujours proches des valeurs réelles.

L'intervalle de tolérance est calculé comme suit:

$$L = \text{Biais}_j\,(\%) \pm t\,(\nu\,;\,\frac{1+\beta}{2})\sqrt{\left(1+\frac{1}{pnB_j^2}\right)CV_{FI,j}} \qquad \text{(III.5)}$$

Avec :

$$\nu = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1}+\frac{1-\frac{1}{n}}{pn}} = \text{Degré de liberté (ddl)}$$

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

$$R_j = \frac{\sigma_{B,j}^2}{\sigma_{W,j}^2}\ ;$$

$$CV_{FI,j} = \frac{\sqrt{\sigma_{FI,j}^2}}{\bar{x}_{j,c}} \times 100$$

t : Variable de STUDENT pour un risque (1-β) et ν ;

β : Quantile de la distribution t de STUDENT à ν degré de liberté.

Critère d'acceptation : Selon les valeurs obtenues de l'intervalle de tolérance, aucune valeur ne sort de l'intervalle [-λ, +λ].

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

$$L_C = \bar{Z} \pm K_{tol} * S_{IT} \qquad \text{(III.6)}$$

Avec :

$$S_{IT} = S_{FI} * \left(\sqrt{1+\frac{1}{I*J*B^2}}\right)\ ; \qquad \text{(III.7)}$$

F. Construction du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude peut être construit de différentes façons, en fonction du type de données traitées. La méthode la plus classique, lorsqu'on a à faire à des concentrations relatives, est celle présentée à la figure III.1 où les performances sont exprimées de façon relative, par un taux de recouvrement. Mais si les données sont des comptages exprimés en

logarithmes, il vaut mieux exprimer les performances, comme des différences entre 2 logarithmes, ce qui est équivalent à un rapport.

Pour construire le profil d'exactitude, les lignes suivantes :

– à reporter sur l'axe horizontal ;

1) Les valeurs de référence moyennes.

– à reporter sur l'axe vertical ;

2) Les limites de tolérance basses relatives ;

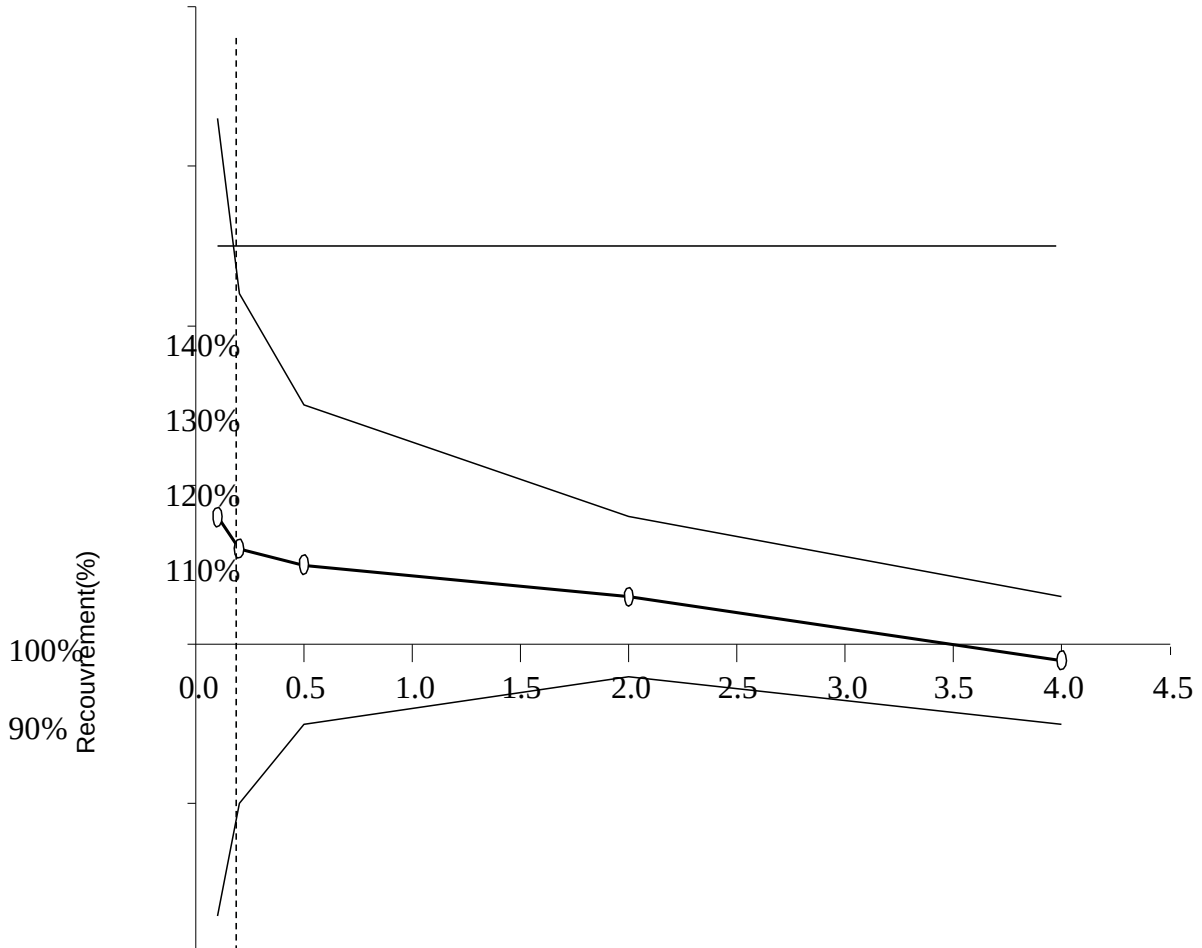
3) Les limites de tolérance hautes relatives ;

4) Les taux de recouvrement moyens ;

5) Les limites d'acceptabilité basses relatives ;

6) Les limites d'acceptabilité hautes relatives.

Reporter ces données sur un graphique en utilisant les valeurs de référence moyennes pour dessiner l'axe des abscisses, comme l'illustre la figureIII.1



80%

70%

BIAIS en %

Figure III.1: Profil d'exactitude exprimé par l et aux de recouvrement

III.5.3. Interpréter le profil d'exactitude pour la validation

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

– **les limites d'acceptabilité ±λ.** Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs.Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence. Le plus souvent, ceslimites sont réglementaires ou issues de la réglementation. Mais dans le cas où il n'existe pas de référence établie, il convient de prendre en compte les attentes des utilisateurs finaux, comme une LQ

– **la proportion** β. Elle représente la proportion de futurs résultats qui seront en moyenne compris dans les intervalles de tolérance. La valeur choisie pour β dépend largement du champ d'application (contrôle sanitaire, contrôle de fabrication, etc.). Il est évident que plus β est petit, par exemple 70%, plus la méthode risque de produire des résultats qui ne correspondent pas aux spécifications annoncées. C'est pourquoi, dans la méthode du profil d'exactitude cette proportion a été fixée à au moins 80%.

III.5.4. Linéarité

- On trace le graphe: Concentration calculée = f (concentration introduite) pour les 03 modèles mathématique cités dans la partie « Fonction de réponse ».
- Pour chaque modèle mathématique, il est nécessaire de déterminer la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination.

- Le coefficient de détermination R^2 doit être supérieur à 0,99.
- Pour le calcul des concentrations calculées, voir la partie « Fonction de Réponse ».

III.5.5.Critères de validation complémentaires

Sur la figure III.2 on note qu'il existe une concentration à partir de laquelle au moins une des bornes de l'intervalle de tolérance coupe une des limites d'acceptabilité. Au-dessus de ce seuil, l'analyste peut garantir que la méthode produira une proportion de résultats au moins égale à β. Selon les règles de décision proposées, la méthode est donc valide puisqu'elle permet de garantir les objectifs fixés. En revanche, en dessous de ce seuil, il n'est pluspossible de conclure à la validité.

Tout naturellement, on peut proposer de définir ce seuilcomme la limite de quantification (LQ) de la méthode. Si on se réfère à l'exemple de la figure III.2, la LQ se situerait entre les niveaux A et B.

Lorsqu'il est nécessaire d'avoir une très bonne estimation de la limite de quantification, il est judicieux d'utiliser un plan de validation avec au minimum K = 4 niveaux. Les deux niveaux les plus bas (notés ici A et B) doivent alors être choisis de façon à encadrer au plus près la LQ supposée.

L'interpolation sera alors d'autant plus exacte que cet encadrement sera étroit. La LQ peut être obtenue exactement en calculant l'abscisse du point d'intersection. Mais les calculs doivent être réalisés sur les valeurs absolues des limites d'acceptabilité et de tolérance car le fait de passer aux valeurs relatives, utilisées en pratique pour la représentation graphique du profil, introduit une interpolation hyperbolique. En effet, le calcul des coordonnées du point d'intersection de deux droites est un problème d'algèbre bien connu.

Pour calculer la LQ entre deux niveaux notés A et B, les notations suivantes sont utilisées : Z les valeurs absolues lues sur l'axe des ordonnées ;

- X les valeurs de référence fournies par l'axe des abscisses.
- x_A et x_B les abscisses des deux niveaux A et B.
- x_{At} et x_{Bt} les ordonnées sur la limite supérieure (ou inférieure) de l'intervalle de tolérance.
- x_{Aa} et x_{Ba} les ordonnées sur la limite supérieure (ou inférieure) d'acceptabilité.
- x_{LQ} l'abscisse du point d'intersection, avec LQ = x_{LQ}.

Les deux droites peuvent être représentées à l'aide d'un système de deux équations, dont la première traduit la limite de l'intervalle de tolérance (paramètres t_0 l'ordonnée à l'origine et t_1 la pente) et la seconde la limite d'acceptabilité (paramètres a_0 et a_1) :

$$Z = t_0 + t_1 * X \qquad \text{(III.8)}$$

$$Z = a_0 + a_1 * X \quad \text{(III.9)}$$

On peut noter que :

- a_0 doit être égal à 0 puisque la limite de l'intervalle d'acceptabilité passe toujours par le zéro.

Si on cherche l'intersection avec la limite supérieure d'acceptabilité (1)

$$Z_{At} = X_a(1 + \lambda) \quad \text{(III.10)}$$

Il faudra prendre 1 – λ si on recherche l'intersection avec la limite inférieure. Pour obtenir la pente t_1, on utilise une règle de trois :

$$t_1 = \frac{Z_{Bt} - Z_{At}}{x_B - x_A} \quad \text{(III.11)}$$

Pour l'ordonnée à l'origine t_0, on l'obtient à partir de la première équation du système

$$t_0 = z_{At} - x_A * t_1 \quad \text{(III.12)}$$

De façon symétrique :

$$a_1 = \frac{Z_{Ba} - Z_{Aa}}{x_B - x_A} \quad \text{(III.13)}$$

$$a_0 = Z_{Aa} - x_A * a_1 \quad \text{(III.14)}$$

On obtenir ainsi la valeur de x_{LQ}:

$$x_{LQ} = \frac{a_0 - t_0}{t_1 - a_1} \quad \text{(III.15)}$$

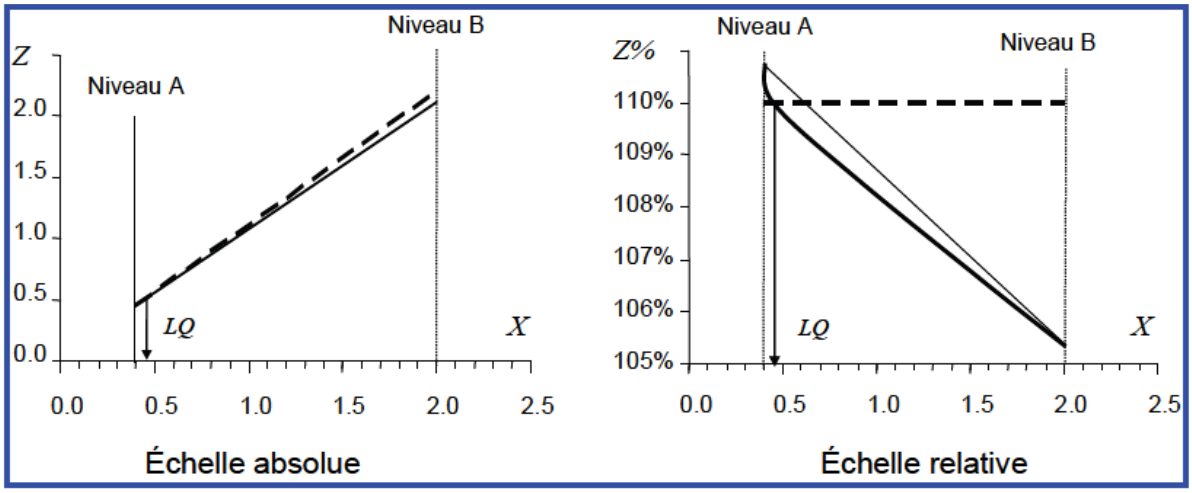


Figure III.2 : illustration du mode de calcul de la limite de quantification

III.5.6. Limite de détection

1 - examen visuel. Applicable aux méthodes non instrumentales ou instrumentales.

2 - rapport signal sur bruit. Cette approche n'est possible que lorsqu'on peut observer la ligne de base de la méthode. La détermination du rapport signal sur bruit est effectuée en comparant les signaux obtenus sur des échantillons de faibles concentrations avec ceux d'échantillons blancs. On estime qu'un rapport entre 3/1 et 2/1 est généralement satisfaisant pour estimer la limite de détection.

Chapitre IV : PROCEDURE EXPERIMENTALE

PROCEDURE EXPERIMENTALE

IV.1. INTRODUCTION

L'industrie pharmaceutique est le secteur économique qui regroupe les activités de recherche, de fabrication et de commercialisation des médicaments. Dans ce chapitre le protocole expérimental et les méthodes statistiques utilisées pour valider une méthode d'analyse seront presentés pour le dosage du «alpha amylase» principe actif dans le produit fini XIMALEX® sirop à 200 UCEIP/mL, un médicament indiqué dans les maux de gorge peu intenses et sans fièvre au moyen du spectre UV-VISIBLE.

L'objectif de ce travail consiste à évaluer statistiquement la validité de cette méthode dans le domaine du dosage entre 80% à 120% et de décrire les procédures d'étalonnage multiparamétriques, de correction de biais, de calcul d'incertitude par l'utilisation d'étalons des réactifs et des équipements certifiés.

IV.2. FICHE TECHNIQUE DU PRODUIT

La fiche technique du sirop Ximalex est représentée dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Sirop XIMALEX 20 000 U CEIP/100ML Suspensuion buvable.

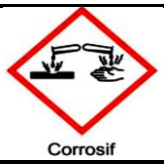
Nom Commercial	**XIMALEX**
Dosage	20 000 U CEIP/100ML
Forme	Sirop
DCI	Alpha-Amylase
Laboratoire	Groupe Saidal
Classe thérapeutique	Anti-Inflammatoires
Classe pharmacologique	Enzymes a visee anti-inflammat.
Conditionnement	FL./100 mL
Commercialisation	Oui

IV.3. MATERIEL ET REACTIFS

IV.3.1. Réactifs

Les Propriétés physicochimiques et réactifs utilisés dans la préparation et le dosage du Ximalex sont donnés dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2: Propriétés physicochimiques et précaution d'emploi des réactifs

Réactifs	Propriétés physicochimique	Précaution d'emploi
Eau distillée	Formule brute : H_2O M : 18g/mol ρ : 1g/cm^3	Aucun
Acide sulfurique	Formule brute : H_2SO_4 96% M : 98,08 g/mol ρ : 1,83 g/cm^3	
Amidon de pomme de terre	Formule brute : $(C_6H_{10}O_5)_n$	Aucun
Sodium phosphate dibasique hepta.hydrate	Formule brute : $Na_2HPO_4.7H_2O$ 99% M : 268,07 g/mol Lot : # SLCB5798	
Iodure de Potassium	Formule brute : KI 99% M : 166 g/mol	
Acide phosphorique	Formule brute : H_3PO_4 85% M : 98 g/mol	

IV.3.1. MATERIEL

Les appareils utilisés dans la préparation et le dosage du Ximalex sont donnés dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3: Appareils utilisés.

Appareils	Marque	Date de qualification
Balance analytique	radwy	12/07/2022
Spectrophotomètre UV-VIS	Perkin-elmer	16/11/2022
pH-mètre	Metrohm	16/02/2023
Bain marie thermoréglé	Memert	08/09/2022
Agitateur à ultra-son	Selecta	/
Agitateur vortex	Ika	/
Agitateur électromagnétique	velp	/



Figure IV.1 : Balance analytique



Figure IV.2 : PH-mètre



Figure IV.3 : Spectrophotomètre UV-VIS



Figure IV.4 : Agitateur à ultra-son



Figure IV.5 : Agitateur électromagnétique à plaque chauffante



Figure IV.6: Agitateur vortex

IV.4. METHODE DE PREPARATION

IV.4.1. Procédure d'analyse

Dans des tubes à essai, on introduit 0.7 m L et1.0 mL du Substrat (Amidon) et: 0.8 mL et 1.5 mL du Tampon à pH 6.3. Les tubes sont placés dans un bain marle à 37 °C et au temps zéro, on introduit 0.5 mL de la solution d'essai dans un autre tube à essai. On laisse attendre les tube pendant exactement 15 minutes, et puis on ajoute 1.5 mL d'acide sulfurique 0.2 N (entraînant une dénaturation de l'enzyme). On agite les tubes et on les remettre dans le bain - marie.

On prend trois nouveaux tubes numérotés 1, 2 et 3 et on ajoute dans chacun 10.0 mL d'eau et 0.5 mL de solution d'iode ($2\ 10^{-3}$N). Ensuite, on introduit 0.5 mL du tube I au tube 1, du tube II 0.5 mL au tube 2 et 0.5 mL du tube III au tube 3 et on agite bien.

On compare les valeurs déterminées au moyen d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de à 540 nm. Le maximum d'absorption est trouvé à l'aide du tube à essai N° 1. L'appareil est réglé à zéro par la solution du tube à essai N° 3 est le blanc.

DO1 = valeur déterminée de la solution du tube N° 1

DO2 = valeur déterminée de la solution du tube N° 2

La teneur en α- Amylase pour 100 mL de sirop :

$$T\left(\frac{\text{UCEIP}}{\text{ml}}\right) = 5 - \left(\frac{3.5*A2}{A1}\right) * \frac{16667*d}{p*100} \qquad \text{(IV.1)}$$

Avec :

p: pesée de l'échantillon en g,

A_1: absorbance du substrat (amidon),

A_2: absorbance de la solution échantillon,

d: densité d'échantillon en g/mL.

IV.4.2. Mode opératoire

A. Solution tampon pH 6.3

26.95 g de phosphate disodique 7 H2O est introduite dans une fiole de 1000 mL contenant 900 mL d'eau. On ajoute une quantité suffisamment concentrée d'acide phosphorique pour obtenir une valeur de pH de 6.3 ± 0.05. La solution est ensuite introduite dans une fiole de 1000 mL remplie avec de l'eau jusqu'au volume.

B. Solution d'iode 0.002 N

2 mL d'une solution d'iode 0.1 N est introduite dans une fiole de 100 mL. On ajoute 2 g d'iodure de potassium et 50 mL d'eau, on rempli avec de l'eau jusqu'au volume apres que la substance soit dissoute.

C. **Substrat**

150 mg d'amidon et 50 mL de solution tampon pH 6.3 sont introduits dans une fiole de 100 mL. On agite jusqu'à la dissolution de la substance en tiédissant si nécessaire. On laisse refroidir et on rempli jusqu'à 100 mL avec la solution tampon pH 6.3.

D. Solution échantillon

Un mélange de 1,56 g du sirop et 20 mL de la solution tampon pH 6.3 est Introduit dans une fiole de 50 mL. Dans une fiole de 50 mL, on introduit 1.00 mL de la dilution précédente, et on rempli jusqu'à 50 mL avec la solution tampon pH 6.3.

Formules de calculs :

$$T\left(\frac{mg}{ml}\right) = \frac{Se * Cst * Puis(st) * d}{Sst * Ce} \qquad (IV.2)$$

Avec :

T : Teneur de parahydroxybenzoate de méthyle en %.

Se : Surface de la solution échantillon.

Sst : Surface de la solution standard.

Cst: Concentration de la solution standard de référence en mg/mL.

Ce: Concentration de la solution échantillon en mg/mL.

d: Densité d'échantillon en mg/mL.

(st): Puissance de standard de référence en mg/mg

IV.5.VALIDATION DE LA PROCEDURE D'ANALYSE

L'objectif d'une procédure est de pouvoir déterminer avec le plus d'exactitude possible chacune des concentrations inconnues que le laboratoire aura à doser ($x \leftrightarrow \mu T$) puis à démontrer que l'écart entre ces concentrations et les concentrations de référence se situent dans les limites d'acceptation [-ʎ, +ʎ] fixées à priori pour chaque type d'application :

$-\lambda < Xi - \mu T < +\lambda$

L'objectif de la validation est de pouvoir donner au laboratoire et aux autorités règlementaires des garanties que chaque résultat qui sera obtenu dans le futur par cette méthodologie sera suffisamment proche de la valeur de l'échantillon à doser, c'est-à-dire que la probabilité que $|X; -\mu T| < \lambda$, doit être supérieur ou égale à une valeur minimale de β

Prob [|xi- µT | < ʎ] β

Xi- µT= erreur totale biais + écart type.

Les limites d'acceptation sont fixées à 5% autour de la valeur cible. La proportion β est égale à 90%.

IV.5.1. Spécificité

La spécificité est la capacité à établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants présents. Il s'agit de démontrer que la substance analysée au sein de la matrice est bien l'analyte recherché. La spécificité se fonde sur une absence d'interférences provenant des excipients, des impuretés ou des produits de dégradation.

IV.5.2. Plan d'expérience

Deux plans d'expériences sont nécessaires, l'un dit d'étalonnage «SE» servant à calculer la fonction de réponse de la méthode, l'autre dit plan de validation «SV» servant à calculer les caractéristiques de la validation. Les standards de validation de la même série sont effectués le même jour que ceux de l'étalonnage afin d'utiliser les fonctions de réponse correspondantes.

IV.5.2.1. Plan d'étalonnage

Trente essais ont été réalisés à cinq niveaux de concentrations avec deux répétitions sur trois séries (5×2×3). Les standards d'Etalonnage « SE» ont été préparés à différentes concentrations en principe actif « Alpha amylase » allant de 0.0048 mg/mL à 0.0072 mg/mL soit de 80% à 120% de l'intervalle de mesure.

Niveau 80% :

- Solution mère (1): dissoudre 150 mg d'Alpha amylase αA dans le tampon phosphate (pH =6.3) et compléter au volume dans une fiole jaugée de 500 mL avec le même solvant.
- Solution standard : prélever 0.8 mL de la solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50mL et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3).

On obtient une concentration finale de 0.0048 mg/mL en Alpha amylase

Niveau 90% :

- Solution mère (1): dissoudre 150 mg d'Alpha amylase αA dans le tampon phosphate (pH =6.3) et compléter au volume dans une fiole jaugée de 500 mL avec le même solvant.

- Solution standard : prélever 0.9 mL de la solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3). On obtient une concentration finale de 0.0054 mg/mL en Alpha amylase

Niveau 100% :

- Solution mère (1): dissoudre 150 mg d'Alpha amylase αA dans le tampon phosphate (pH =6.3) et compléter au volume dans une fiole jaugée de 500 mL avec le même solvant.
- Solution standard : prélever 1mL de la solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3). On obtient une concentration finale de 0.006 mg/ mL en Alpha amylase.

Niveau 110% :

- Solution mère (1): dissoudre 150 mg d'Alpha amylase αA dans le tampon phosphate (pH =6.3) et compléter au volume dans une fiole jaugée de 500 mL avec le même solvant.
- Solution standard : prélever 1.mL de la solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3). On obtient une concentration finale de 0.0066 mg/mL en Alpha amylase.

Niveau 120% :

- Solution mère (1): dissoudre 150mg d'Alpha amylase αA dans le tampon phosphate (pH =6.3) et compléter au volume dans une fiole jaugée de 500 mL avec le même solvant.
- Solution standard : prélever 1.2 mL de la Solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50ml et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3). On obtient une concentration finale de 0.0072 mg/mL en Alpha amylase.

IV.5.2.2. Plan de validation

Quarante cinq essais ont été réalisés à cinq niveaux de concentrations avec trois répétitions sur trois séries (5×3×3). Les standards de validation «SV» ont été préparés à différentes concentrations en principe actif « Alpha amylase » allant de 0.0048 mg/mL à 0.0072 mg/mL soit de 80% à 120% de l'intervalle de mesure.

Il s'agit d'une gamme préparée à partir d'une forme reconstituée dont la concentration correspond à 200 UCEIP/ml en principe actif « Alpha amylase ».

Niveau 80% :

Solution mère (1): peser 1.56 g du XIMALEX sirop à 200 UCEIP/mL dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3).

Solution échantillon : prélever 0.8 mL de la Solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3). On obtient une concentration de 0.0048mg/ mL en Alpha amylase.

Niveau 90% :

Solution mère (1): peser 1.56 g du XIMALEX sirop à 200 UCEIP/mL dans une fiole jaugée de 50ml et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3).

Solution échantillon : prélever 0.9 mL de la Solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3). On obtient une concentration de 0.0054 mg/ mL en Alpha amylase.

Niveau 100% :

Solution mère (1): peser 1.9 g du XIMALEX sirop à 200 UCEIP/mL dans une fiole jaugée de 50ml et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3).

Solution échantillon : prélever 1mL de la Solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3). On obtient une concentration de 0.006mg/ mL en Alpha amylase.

Niveau 110% :

Solution mère (1): peser 1.9 g du XIMALEX sirop à 200 UCEIP/mL dans une fiole jaugée de 50ml et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3).

Solution échantillon : prélever 1.1mL de la Solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50ml et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3). On obtient une concentration de 0.0066mg/ mL en Alpha amylas.e

Niveau 120% :

Solution mère (1): peser 1.9g du XIMALEX® sirop à 200 UCEIP/mL dans une fiole jaugée de 50ml et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3).

Solution échantillon : prélever 1.2ml de la Solution mère (1) dans une fiole jaugée de 50ml et compléter au volume avec tampon phosphate (pH=6.3). On obtient une concentration de 0.0072mg/mL en Alpha amylase.

IV.5.3. Fonction de réponse

Pour chaque série, on calcule la fonction de réponse en utilisant un même modèle théorique, on teste la pente par le test de Fischer.

IV.5.4. Alignement des observations

Il est indispensable de s'assurer qu'au sein d'un niveau de concentration donnée, les concentrations soient identiques pour toutes les séries, si ce n'est pas le cas, il faut alors les aligner sur une même concentration moyenne.

IV.5.5. Prédiction inverse

Sur la base de réponses des standards de validation et à partir de la fonction de réponse, on calcule pour chacune des séries les concentrations correspondantes.

IV.5.6. Justesse et fidélité

La limite d'acceptation λ étant fixée, pour chaque niveau de concentration, la justesse et la fidélité de la procédure vont être calculées.

IV.5.7. Intervalle de tolérance

Au terme de ces deux opérations, les limites de confiance unilatérales de l'exactitude pour chaque niveau de concentration ont été estimées.

IV.5.8. Profil d'exactitude

La limite d'acceptation étant fixée et à l'issu de l'estimation des limites de confiance unilatérales de l'exactitude, les profils d'exactitudes ont été tracés correspondants au modèle mathématique choisi.

IV.6. ANALYSES EFFECTUEES SUR LE SIROP XIMALEX

IV.6.1. Aspect

Liquide visqueux de couleur brunâtre à odeur caractéristique.

IV.6.2. Densité

La densité relative «d » d'une substance est le rapport entre la masse d'un certain volume de cette substance à 20°C et la masse d'un volume égale d'eau à la même température. La densité a été déterminée à l'aide d'un pycnomètre à 20°C.

IV.6.3. pH

Le pH est une grandeur qui présente conventionnellement la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse.

IV.6.4. Dosage de l'Alpha amylase par l'UV-Vis

A. Définition

L'analyse spectrophotométrie est fondée sur l'étude du changement d'absorption de la

lumière par un milieu, en fonction de la variation de la concentration d'un constituant. On détermine la concentration d'une substance en mesurant l'absorption relative de la lumière par rapport à celle d'une substance de concentration connue. La spectrométrie (UV) s'utilise principalement pour l'analyse quantitative et qualitative d'une molécule [34].

Le domaine spectral est subdivisé en trois (03) plages :

- Proche UV : 190 – 400 nm
- Visible : 400 – 800 nm
- Très proche IR : 800 – 1100 nm

B. Détermination de l'absorbance

L'absorbance (*A*) d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance (*T*) pour un rayonnement monochromatique. Elle s'exprime par l'équation :

$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) \qquad \text{(IV.3)}$$

- $T = I/I_0$
- I_0 = Intensité du rayonnement monochromatique incident
- I = Intensité du rayonnement monochromatique transmis

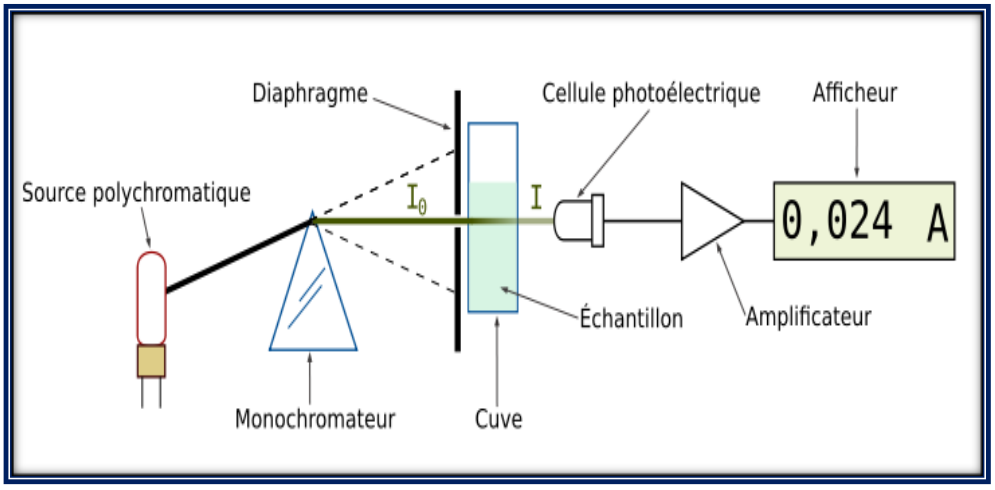


Figure IV.7 : Schéma du principe du spectromètre UV-Visible [35]

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration, et à la longueur du trajet optique(distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

$$A_\lambda = \varepsilon \cdot l \cdot c \qquad \text{(IV.4)}$$

- A_λ : l'Absorbance
- ε : La concentration de la substance absorbante (en $mol.m^{-3}$)
- l : La longueur du trajet optique (en m)
- c : Le coefficient d'extinction de la substance absorbante en solution (en $mol^{-1}.m^2$)

Chapitre V : RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse chimique du «alpha amylase» principe actif dans le produit fini XIMALEX® sirop à 200 UCEIP/ml nécessite des procédures de mise au point de méthodes de dosage, d'étalonnage et de validation des résultats. La démarche qualité a pour objectif d'assurer la fiabilité et la traçabilité des résultats.

V.1. ANALYSES EFFECTUEES SUR LE SIROP XIMALEX

V.1.1. Aspect

Un flacon en plastique contenant un liquide brun sucré, aromatisé à la mandarine et abricot.

V.1.2. pH

Le pH du produit fini est 6.43. Cette valeur est acceptable car elle est en concordance avec la norme 5 à 7.

V.1.3. Volume moyen

Le volume est 102 mL (conforme à la norme 90 à 110 mL).

V.1.4. Densité

La densité est de 1.26 g/mL. La valeur est en concordance avec la norme 1.08 – 1.32 g/mL.

V.1.5. Dosage du principe actif (alpha amylase) par UV-VIS

DO Standard = 0.0517

DO Echantillon = 0.023

$$T_{\alpha\, amylase} = \left[5 - \frac{3.5 * 0{,}023}{0{,}0517}\right] * \frac{16667 * 1{,}26312}{1{,}9111 * 100} = 379{,}27\, UCEIP/mL$$

Le titre obtenu pour le principe actif dans le mélange correspond aux limites des normes de la pharmacopée Européenne (> 2600 UCEIP/mL). On peut dire que le produit fini est fabriqué dans de bonnes conditions.

V.2. DONNEES BRUTES « STANDARDS D'ETALONNAGE »

Les données brutes des standards d'étalonnage et de validation sont représentées sur le tableau V.1.

Tableau V.1: Données brutes des standards d'étalonnages.

Niveau de concentration (%)	Série N°1			
	Concentration introduite (µg/mL)	Signal obtenu E--S	Signal obtenu S	Réponse obtenue R
0,800	1,6000	0,0761	0,1004	0,5216
		0,0764	0,1004	0,5193
		0,0765	0,1004	0,5185
0,900	1,8000	0,0672	0,1004	0,5905
		0,0673	0,1004	0,5898
		0,0671	0,1004	0,5913
1,000	2,0000	0,0585	0,1004	0,6579
		0,0584	0,1004	0,6587
		0,0585	0,1004	0,6579
1,100	2,2000	0,0517	0,1004	0,7106
		0,0519	0,1004	0,7091
		0,0521	0,1004	0,7075
1,200	2,4000	0,0448	0,1004	0,7641
		0,0447	0,1004	0,7648
		0,0449	0,1004	0,7633

Niveau de concentration (%)	Série N°2			
	Concentration introduite (µg/mL)	Signal obtenu E--S	Signal obtenu S	Réponse obtenue R
0,800	1,6064	0,0726	0,0968	0,5278
		0,0731	0,0968	0,5238
		0,0729	0,0968	0,5254
0,900	1,8072	0,0644	0,0968	0,5937
		0,0645	0,0968	0,5929
		0,0645	0,0968	0,5929
1,000	2,0080	0,0565	0,0968	0,6571
		0,0567	0,0968	0,6555
		0,0569	0,0968	0,6539
1,100	2,2088	0,0504	0,0968	0,7062
		0,0498	0,0968	0,7110
		0,0501	0,0968	0,7086

1,200	2,4096	0,0437	0,0968	0,7600
		0,0434	0,0968	0,7624
		0,0432	0,0968	0,7640

Niveau de concentration (%)	Série N°3			
	Concentration introduite (µg/mL)	Signal obtenu E--S	Signal obtenu S	Réponse obtenue R
0,800	1,6043	0,0745	0,0987	0,5240
		0,0742	0,0987	0,5264
		0,0745	0,0987	0,5240
0,900	1,8048	0,0659	0,0987	0,5918
		0,0661	0,0987	0,5902
		0,0660	0,0987	0,5910
1,000	2,0053	0,0581	0,0987	0,6533
		0,0581	0,0987	0,6533
		0,0580	0,0987	0,6541
1,100	2,2059	0,0522	0,0987	0,6998
		0,0520	0,0987	0,7013
		0,0521	0,0987	0,7006
1,200	2,4064	0,0446	0,0987	0,7597
		0,0444	0,0987	0,7612
		0,0443	0,0987	0,7620

V.2.1. Fonctions de réponse

La Fonction de réponse a été déterminée sur la base des données brutes des standards d'étalonnage « SE ». La relation entre la réponse Y (Réponse de l'instrument) et la quantité X (concentration). Trois modèles mathématiques ont été choisis, à savoir :

1. $Y = ax + b$

2. $Y = ax$

3. $Y = a_{100\%}\, x$

V.2.1.1. Modèle Y= ax+b

Le tableau V.2 regroupe les résultats des calculs statistiques pour le modèle y=ax+b pour chaque série utilisée.

Tableau V.2 : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Ximalex avec la fonction : y = ax +b

Série N°1		Série N°2		Série N°3	
Concentration introduite (µg/mL) S1	**Réponse obtenue R1**	**Concentration introduite (µg/mL) S2**	**Réponse obtenue R2**	**Concentration introduite (µg/mL) S3**	**Réponse obtenue R3**
1,600	0,520	1,606	0,526	1,604	0,525
1,800	0,591	1,807	0,593	1,805	0,591
2,000	0,658	2,008	0,656	2,005	0,654
2,200	0,709	2,209	0,709	2,206	0,701
2,400	0,764	2,410	0,762	2,406	0,761

Les courbes d'étalonnage du Ximalex obtenues avec la fonction y = ax+b pour les trois séries sont représentée sur la figure V.1.

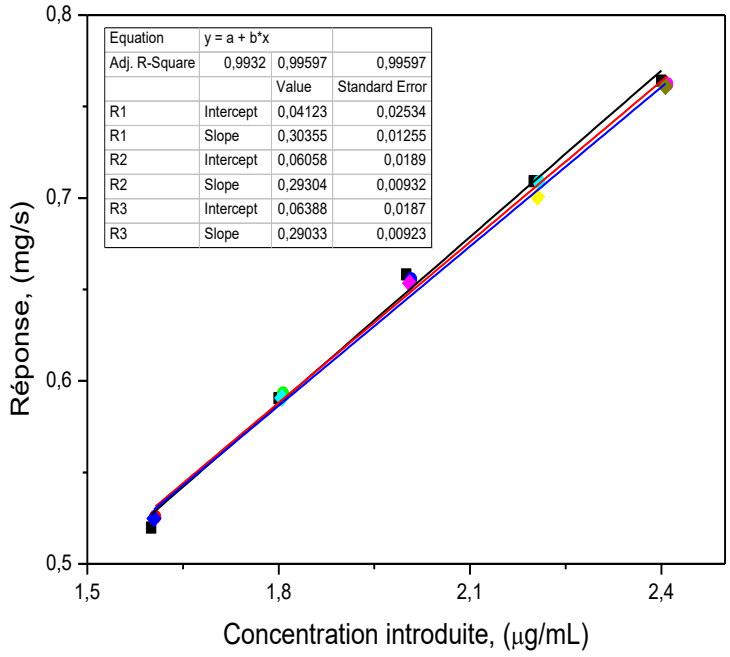


Figure V.1: Courbes d'étalonnage du Ximalex obtenues avec la fonction y =ax+ b.

Tableau V.3 : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Ximalex : y = ax+b

Modèle mathématique	Séries	Pente	Ordonnée à l'origine	Coefficient de détermination
Y = a*x+b	**N°1**	**0,3035**	**0,0412**	0,9949
	N°2	**0,2930**	**0,0606**	0,9970
	N°3	**0,2903**	**0,0639**	0,9970

V.2.1.2. Modèle Y= a x

Les courbes d'étalonnage du Ximalex obtenues avec la fonction y = ax pour les séries 1 , 2 et 3 sot représentées sur la figure V.2.

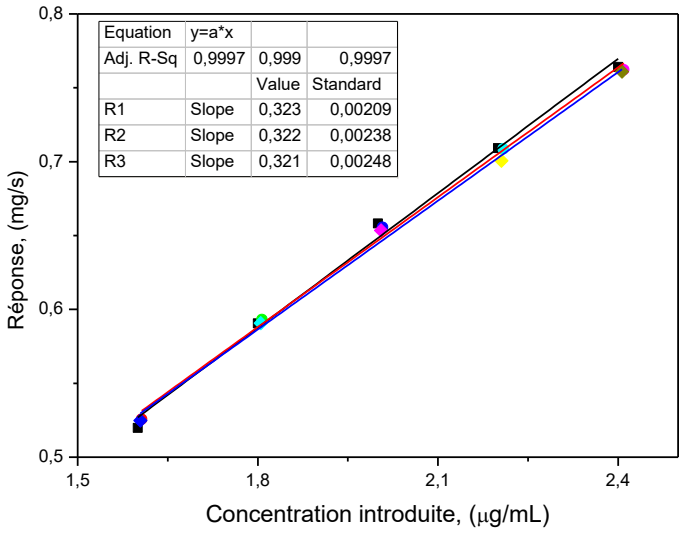


Figure V.2 : Courbes d'étalonnage du Ximalex obtenues pour la fonction y =ax.

Le tableau V.4 regroupe les résultats des calculs statistiques pour le modèle y=ax pour chaque série utilisée :

Tableau V.4 : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Ximalex avec la fonction : y = ax

Modèle mathématique	**Séries**	**Pente A**	**Coefficient de détermination R^2**
Y = a*x	N°1	0,3238	0,9904
	N°2	0,3226	0,9866
	N°3	0,3216	0,9852

V.2.1.3. Modèle Y= 100% x

Le modèle mathématique le plus approprié est (Y =100%), pour lequel on peut garantir que la procédure d'analyse sera capable, en routine, de produire, en moyenne, au moins 95% de résultats acceptables, c'est-à-dire situés à ± 5% de la vraie valeur d'un échantillon. Le tableau V.5 regroupe les résultats des calculs statistiques pour la droite passant par l'origine est un point de la gamme qui est le 100% pour chaque série utilisée :

Tableau V.5 : Résultats des réponses en fonction des concentrations introduites du Ximalex pour la gamme 100%

Série N°1		Série N°2		Série N°3	
Concentration introduite (µg/mL) S1	**Reponse (mg/s) R1**	**Concentration introduite (µg/mL) S2**	**Réponse (mg/s) R2**	**Concentration introduite (µg/mL) S3**	**Reponse (mg/s) R3**
1,600	0,527	1,606	0,518	1,604	0,511
1,800	0,592	1,807	0,582	1,805	0,575
2,000	0,658	2,008	0,647	2,005	0,638
2,200	0,724	2,209	0,712	2,206	0,702
2,400	0,790	2,410	0,777	2,406	0,766

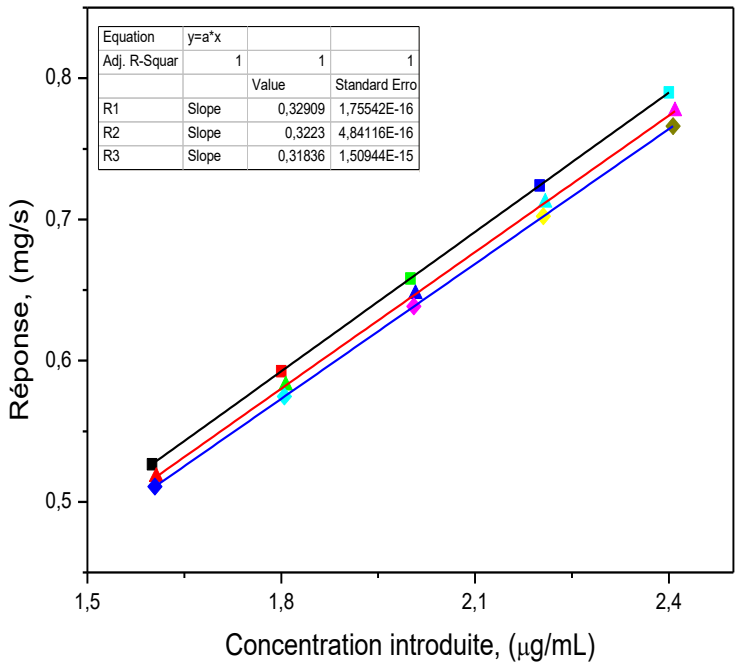


Figure V.3 : Courbes d'étalonnage du Ximalex obtenues pour la gamme 100%.

Tableau V.5 : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Ximalex pour la gamme 100%

Modèle mathématique	Séries	Pente	Coefficient de Détermination R^2
Y = 100%	N°1	0,3291	1,000
	N°2	0,3223	1,000
	N°3	0,3184	1,000

Les résultats obtenus à partir des standards d'étalonnage nous ont permis de tracer les modèles d'étalonnages représentés dans les figures V.1, V.2 et V.3. Avec les trois fonctions choisies à savoir : les régressions linéaires pour les trois séries.

A la lumière des résultats obtenus, en se basant sur les coefficients de détermination trouvés qui sont de l'ordre de l'unité, l'équation linéaire de la forme y=100% a été retenue. Ce modèle a été utilisé pour la suite de notre travail.

V.3. DONNEES BRUTES « STANDARDS DE VALIDATION »

Les données brutes des standards de validation sont représentées dans le tableau V. 6

Tableau V.6: Données brutes des standards de validation

Niveau de concentration (%)	Série N°1			
	Concentration introduite (µg/ml)	Signal obtenu E—S	Signal obtenu S	Réponse obtenue R1
0,800	169,6000	0,0752	0,1004	0,5286
		0,0752	0,1004	0,5286
		0,0753	0,1004	0,5278
0,900	190,8000	0,0672	0,1004	0,5905
		0,0673	0,1004	0,5898
		0,0673	0,1004	0,5898
1,000	212,0000	0,0584	0,1004	0,6587
		0,0585	0,1004	0,6579
		0,0583	0,1004	0,6595
1,100	233,2000	0,0516	0,1004	0,7114
		0,0514	0,1004	0,7129
		0,0515	0,1004	0,7122

1,200	254,4000	0,0421	0,1004	0,7850
		0,0419	0,1004	0,7865
		0,0418	0,1004	0,7873

Niveau de concentration (%)	**Série N°2**			
	Concentration Introduite (µg/mL)	**Signal obtenu E—S**	**Signal obtenu S**	**Réponse obtenue R2**
0,800	203,3067	0,0742	0,0968	0,5149
		0,0740	0,0968	0,5165
		0,0741	0,0968	0,5157
0,900	228,7200	0,0652	0,0968	0,5872
		0,0654	0,0968	0,5856
		0,0651	0,0968	0,5880
1,000	254,1333	0,0571	0,0968	0,6523
		0,0572	0,0968	0,6515
		0,0570	0,0968	0,6531
1,100	279,5467	0,0511	0,0968	0,7005
		0,0513	0,0968	0,6989
		0,0510	0,0968	0,7013
1,200	304,9600	0,0415	0,0968	0,7777
		0,0412	0,0968	0,7801
		0,0414	0,0968	0,7785

Niveau de concentration (%)	**Série N°3**			
	Concentration Introduite (µg/mL)	**Signal obtenu E—S**	**Signal obtenu S**	**Réponse obtenue R**
0,800	608,9600	0,0757	0,0987	0,5146
		0,0758	0,0987	0,5138
		0,0762	0,0987	0,5106
0,900	685,0800	0,0674	0,0987	0,5800
		0,0677	0,0987	0,5776

		0,0677	0,0987	0,5776
1,000	761,2000	0,0602	0,0987	0,6367
		0,0604	0,0987	0,6351
		0,0605	0,0987	0,6344
1,100	837,3200	0,0525	0,0987	0,6974
		0,0527	0,0987	0,6958
		0,0528	0,0987	0,6950
1,200	913,4400	0,0442	0,0987	0,7628
		0,0441	0,0987	0,7636
		0,0440	0,0987	0,7644

V.3.1. Fonction de réponse

La Fonction de réponse a été déterminée sur la base des données brutes des standards de validation « SV ». Le tableau V.7 regroupe les paramètres de validation obtenus pour le Ximalex.

Tableau V.7 : Paramètres de validation obtenus pour le Ximalex pour la gamme 100%

Modèle mathématique	**Séries**	**Pente**	**coefficient de détermination**
Y = 100%	**N°1**	0,3291	1,000
	N°2	0,3223	1,000
	N°3	0,3184	1,000

V.3.2. Prédiction inverse

Le calcul des concentrations prédites a été effectué sur la base des réponses des standards de validation « SV » et à partir de la fonction de réponse obtenue par les standards d'étalonnage « SE » suivant l'équation relation V.1.

$$X_{ijk,c} = \frac{Y_{ijk} - \alpha}{\beta_i} \qquad (V.1)$$

Les résultats obtenus sont regroupés sur le tableau V.8

Série N°1		Série N°2		Série N°3	
Concentration introduite (µg/mL)	**Concentration Calculée (µg/mL)**	**Concentration introduite (µg/mL)**	**Concentration calculée (µg/mL)**	**Concentration introduite (µg/mL)**	**Concentration calculée (µg/mL)**
1,6020	1,6061	1,6020	1,5977	1,6020	1,6164
	1,6061		1,6027		1,6139
	1,6037		1,6002		1,6040
1,8022	1,7944	1,8022	1,8220	1,8022	1,8218
	1,7921		1,8170		1,8144
	1,7921		1,8245		1,8144
2,0025	2,0016	2,0025	2,0240	2,0025	2,0000
	1,9992		2,0215		1,9951
	2,0039		2,0265		1,9926
2,2027	2,1616	2,2027	2,1736	2,2027	2,1906
	2,1663		2,1686		2,1857
	2,1640		2,1760		2,1832
2,4030	2,3853	2,4030	2,4129	2,4030	2,3961
	2,3900		2,4204		2,3986
	2,3923		2,4154		2,4010

V.3.3. Estimation de la justesse et de la fidélité

V.3.3.1. Estimation de la justesse

Le biais et le recouvrement ont été calculés en utilisant les deux equations ci-dessous.

$$Biais\ (\%) = \frac{\bar{x}_{j,c} - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} * 100 \qquad (V.2)$$

$$\mathrm{Re}\,couvrement\ (\%) = \frac{\bar{x}_{j,c}}{\bar{x}_j} * 100 \qquad (V.3)$$

Le tableau V.9 regroupe les valeurs de justesse obtenues exprimée en termes de biais absolu, et du pourcentage de recouvrement du sirop Ximalex pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau V.9 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour le Ximalex.

Niveaux de concentration	Biais (%)	Recouvrement (%)
0,800	0,228	100,228
0,900	0,449	100,449
1,000	0,234	100,234
1,100	-1,285	98,715
1,200	-0,068	99,932

Le biais de chaque niveau ne dépasse pas les 5% en valeur absolue, la méthode est donc valide .

V.3.3.2. Estimation de la fidélité

La fidélité de la méthode de dosage a été exprimée en fonction du pourcentages du coefficient de variation (CV) obtenu à partir de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire et ce pour tous les niveaux de concentration en utilisant les modèles d'étalonnage déjà établis. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau V.10. La Répétabilité et la Fidélité intermédiaire ont été calculées à partir dles équations V.4 et V.5.

$$\sigma^2_{\mathrm{Re}\,j} = \sigma^2_{wj} \qquad (V.4)$$

$$\sigma^2_{fej} = \sigma^2_{wj} + \sigma^2_{Bj} \qquad (V.5)$$

Tableau V.10 : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour le Ximalex

Niveaux de concentration	CV répétabilité (%)	CV fidélité intermédiaire (%)
0,800	0,257	0,660
0,900	0,188	1,473
1,000	0,147	1,289
1,100	0,156	0,917
1,200	0,139	0,999

Ce test a pour but de permettre à l'analyste d'estimer la dispersion associée à la mesure (erreur aléatoire), évaluée dans plusieurs conditions, de répétabilité (intra-série ou intra-jour), de fidélité intermédiaire (inter-jours). Dans cette approche, nous n'avons traité que les conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire.

Les valeurs du CV de la répétabilité et celles du CV de la fidélité intermédiaire ne dépassent pas les 2% en valeur absolue pour tous les niveaux. De ce fait les résultats trouvés ont démontré une bonne fidélité en termes de conformité des méthodes de dosage effectuées.

V.3.4. Estimation de l'exactitude

Le profil d'exactitude est une méthode qui permet de définir un intervalle de quantification pour chaque fonction de réponses étudiée et cela par l'intersection entre les limites de tolérance et d'acceptabilité. L'exactitude a été calculée par la détermination de l'erreur totale entre les pesées introduites et celles retrouvées des différentes séries afin de valider la méthode du dosage du Ximalex.

A cet fin, le modèle de régression linaire y=100% a été choisi. Le tableau V.11 montre les résultats obtenus des profils d'exactitudes.

Exactitude = |Biais % + fidélité intermédiaire = Erreur totale = justesse + Fidélité

Tableau V.11 : Profil d'exactitude obtenu pour le Ximalex.

Niveaux de concentration	Biais (%)	CV fidélité intermédiaire (%)	Erreur totale (%)
80%	0,23	0,66	0,89
90%	0,45	1,47	1,92
100%	0,23	1,29	1,52
110%	-1,29	0,92	2,20
120%	-0,07	1,00	1,07

A partir des résultats trouvés, les valeurs obtenues pour chaque niveau de concentration, la méthode utilisée est considérée valide sur l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation. Aucune valeur de l'erreur totale ne sort de l'intervalle [-5%, +5%], la méthode est donc exacte.

V.3.5. Intervalle de tolérance

V.3.5.1. Intervalle de tolérance (Biais)

Les limites de tolérance de biais ont été calculées pour chaque niveau de concentration

$$L = Biais_{\,j}\,(\%) \pm t\,(v;\frac{1+\beta}{2})\sqrt{(1+\frac{1}{pnB_j})CV_{FI,j}} \qquad (V.6)$$

Avec

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{pn}} \qquad (V.7)$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R_j+1}{nR_j+1}} \qquad (V.8)$$

$$R_j = \frac{\sigma^2_{B,j}}{\sigma^2_{w,j}} \qquad (V.9)$$

$$CV_{FI,j} = \frac{\sqrt{\sigma^2_{FI,j}}}{\tilde{x}_{j,c}} * 100 \qquad (V.10)$$

Les résultats sont présentés dans le tableau V.12

Tableau V. 12 : Limites de tolérance du Ximalex.

Niveaux de concentration	Min (%)	Biais (%)	Max (%)
80	-2,48	0,23	2,93
90	-3,64	0,45	4,54
100	-3,59	0,23	4,06
110	-4,51	-1,29	1,94
120	-3,43	-0,07	3,30

Selon les valeurs obtenues pour chaque niveau, toutes les valeurs des erreurs totales appartiennent à l'intervalle [-5%, +5%].

V.3.5.2. Intervalle de tolérance (Concentration)

Les limites de tolérance de concentration ont été calculées pour chaque niveau de concentration et sont présentées dans le tableau V.13.

Tableau V. 13 : Limites de tolérance du Ximalex.

Limite intervalle de tolérance basse (µg/mL)	Limite intervalle de tolérance basse (%)	Concentration moyenne calculée (µg/mL)	Recouvrement (%)	Limite intervalle de tolérance haute (µg/mL)	Limite intervalle de tolérance haute (%)	Concentration moyenne calculée (µg/mL)
1,5709	98,0590	1,6056	100,2282	1,6404	102,3974	1,6020
1,7218	95,5374	1,8103	100,4487	1,8988	105,3599	1,8022
1,9213	95,9446	2,0071	100,2339	2,0930	104,5232	2,0025
2,1083	95,7134	2,1744	98,7150	2,2405	101,7166	2,2027
2,3217	96,6193	2,4013	99,9317	2,4809	103,2441	2,4030

Selon les valeurs de l'intervalle de tolérance aucune valeur ne sort des limites du risque 5% en valeur absolue, la méthode est considérée valide dans le temps tant que la concentration du principe actif «Alpha amylase » est située entre 80% et 120% de la concentration nominale.

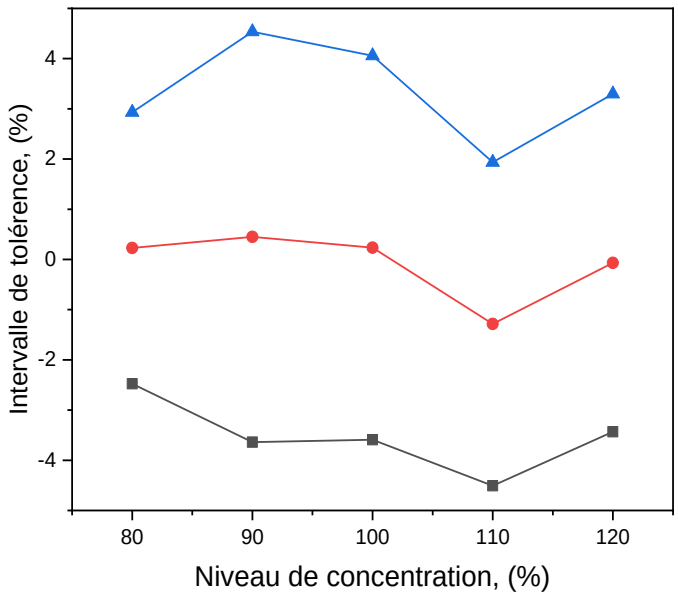


Figure V.4: profil d'exactitude de biais pour le Ximalex pour ʎ= ± 5% et β=90%

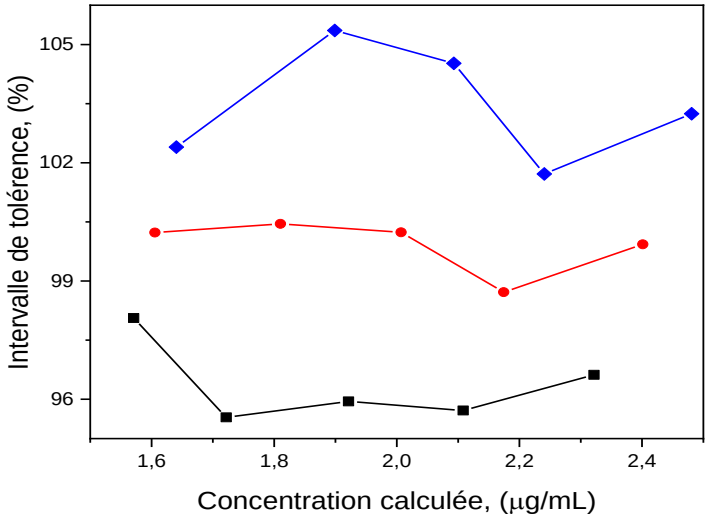


Figure V.5: profil d'exactitude de concentration pour le Ximalex pour λ=±5% etß=90%

V.3.6. Linéarité

La linéarité représente la proportionnalité entre les concentrations introduites et celles prédites tableau V.14. Son calcul nécessite différents paramètres permettant de tracer des droites de régression linéaire de la concentration comme le montre la figure V.6.

Tableau V.14 : Concentrations prédites en fonction des concentrations introduites pour les trois séries

Niveaux	C. théorique (µg/ml)	CM. calculée S1	CM. calculée S1	CM. calculée S1
1	1,6019712	1,6053	1,6002	1,6114
2	1,8022176	1,7928	1,8212	1,8169
3	2,002464	2,0016	2,0240	1,9959
4	2,2027104	2,1640	2,1727	2,1865
5	2,4029568	2,3892	2,4162	2,3986

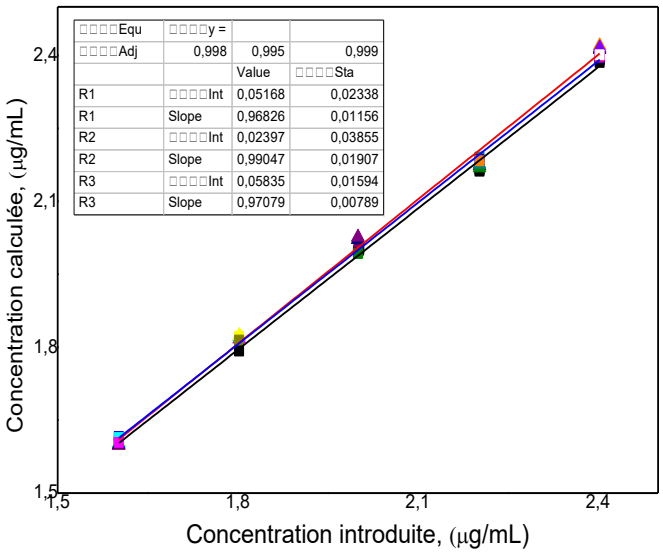


Figure V.6: Droites linéaires entre les concentrations prédites en fonction des concentrations introduites du Ximalex.

La linéarité a été évaluée à partir de cinq niveaux de concentration avec trois répétitions indépendantes. Les droites de régression linéaire obtenues pour le Ximalex sont de la forme :

$$C_{calculée1} = 0{,}968 * C_{introduite1} + 0{,}051$$
$$C_{calculée2} = 0{,}990 * C_{introduite2} + 0{,}023$$
$$C_{calculée3} = 0{,}970 * C_{introduite3} + 0{,}057$$

Les coefficients de détermination R^2 sont de l'ordre de 0,998, 0,995 et 0,9999 respectivement. Ce qui signifie que la variabilité totale de la concentration prédite peut être expliquée à plus de 99 % par la variabilité de la concentration introduite. Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est très acceptable.

Sa valeur peut nous orienter, surtout par le fait qu'elle est très proche de 1. L'étude statistique de la linéarité pour le Ximalex, illustrée par le tableau V.15, a confirmé que la pente est statistiquement non différente de 1 et que l'ordonnée à l'origine est comparable statistiquement avec 0 ce qui prouve la validité de la régression et de la linéarité.

V.3.7. Limites de quantification

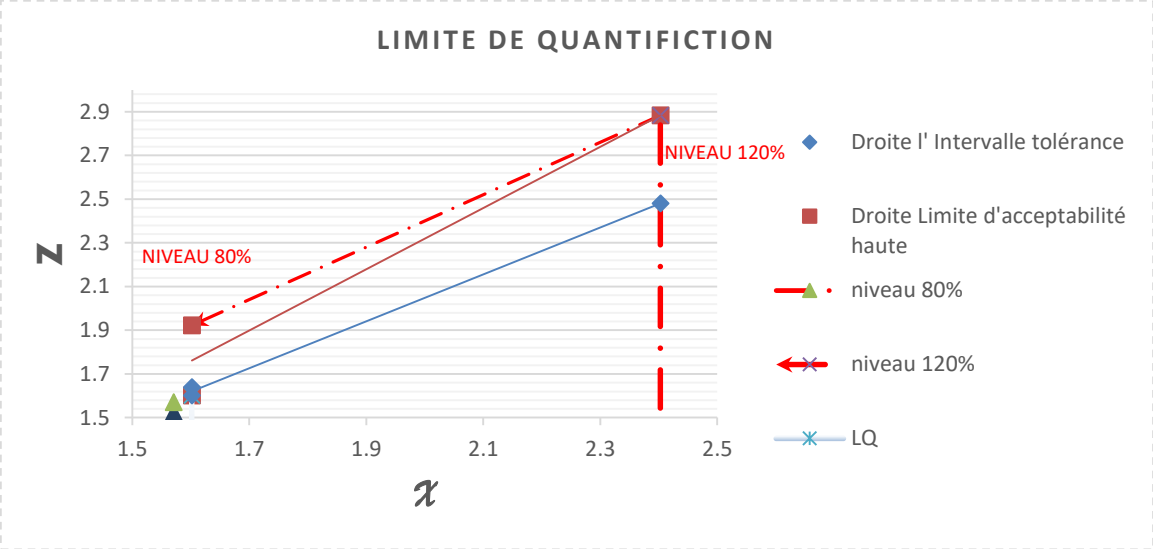
Les limites de quantification ont été obtenues à partir du calcul des concentrations hautes 120% et basses 80% pour lesquelles les limites de l'intervalle de tolérance sont incluses dans la limite d'acceptabilité fixée à ± 5%. L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre

les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

Tableau V.15 : Calcul des limites de quantification

Lingne	***80%***	***120%***
Concentration moyenne théorique	*1,6019712*	*2,4029568*
Limite intervalle tolérance haute	*1,640376373*	*2,480911598*
Limite d'acceptabilité haute	*1,92236544*	*2,88354816*
Droite	***Pente***	***Origine***
Intervalle tolérance	*1,0493762*	*-0,040694078*
Limite d'acceptabilité haute	*1,2*	*-0,281989067*
Limite de quantification en mg/mL	***1,6019712***	

La limite de quantification basse est déterminée par l'intersection entre la limite d'acceptabilité et la limite de tolérance.



Chapitre I : CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La présente étude a pour objectif, à la mise au point et à la validation d'une méthode de dosage d'un médicament sous forme de sirop ''Ximalex » au moyen d'une méthode d'analyse par UV- visible en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision.

Dans la première partie, un plan d'étalonnage a été effectué pour générer un modèle d'étalonnage pour chaque série permettant d'établir une relation entre la réponse analytique et la concentration introduite. A partir des résultats trouvés, nous avons pu démontrer que la méthode adoptée est spécifique, linéaire, exacte, fidèle et robuste.

La deuxième partie a été consacré à la réalisation d'un plan de validation afin d'estimer le biais et la fidélité de la méthode. Les intervalles de tolérance apparié à des limites d'acceptation nous ont permis de tracer le profil d'exactitude qui caractérise la validité de la méthode dans l'intervalle de concentration étudié avec une proportion ß=95% des mesures dans les limites d'acceptations (±5%).

Les résultats obtenus répondaient à toutes les exigences et les performances spécifiques élaborées dans cette approche; ce qui prouve la validité de la méthode utilisée et de sa capacité à être appliquée dans le contrôle de qualité pour le dosage du Ximalex.

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

En perspectives, nous recommandons de compléter les résultats obtenus avec des études de la robustesse, de la stabilité des solutions et des différents facteurs influençant le dosage en routine.

Enfin la validation est une étape fondamentale non seulement dans le développement de nouvelles méthodes, sur le plan technique, mais aussi sur 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.

Chapitre IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAHIQUES

[1] https://www.who-int, 01/12/2011.

[2] Talber M., Willoquet G. Guide pharmaco clinique ,5ème édition. Le moniteur, 2017.

[3] Définition du Code de la Santé Publique (art. L 5111-1 actualisé JO du 27/02/07).

[4] Sofowora, E.A. Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. John Wiley and Sons Ltd., Hoboken. (1982), 64-79.

[5] Briskin, D.P., Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant physiology, 2000, 507-514.

[6] Da Silva, P.P. and L. Meijer, Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique-Pierre Potier (1934-2006). médecine/sciences, 2012, 534-542.

[7] Remy, P., G. Dirheimer, and J. Ebel, Analogues de nucléosides polyphosphates: I. Synthèse de l'adénosine 5′-phosphohypophosphate. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1967, 99-107.

[8] Lafontan, M., M. Berlan, and M. Prud'Hon, Les agonistes bêta-adrénergiques. Mécanismes d'action: lipomobilisation et anabolisme. Reproduction Nutrition Développement, 1988, 61-84.

[9] Ragued H, Guerch A. Contrôle de qualité physicochimique des formes intermédiaire des comprimés au cours de la validation du procédé de fabrication », Thèse de doctorat en pharmacie, Université Saad Dahleb- Blida- Algérie, 2019.

[10] Le Hir, A., Chaumeil., J-C., Brossard, D. Pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 9ème édition. Paris. Elssevier-Masson, 2009.

[11] Dennis W D. Cours de pharmacie : Etapes d'élaboration d'un médicament : du P.A. au produit fini Place de la pharmacie galénique origines & classification des excipients. Université Joseph Fourier de Grenoble, 2012.

[12] Goole, J. Développement et évaluation de mini comprimé flottants à libération prolongée ,thèse de doctorat en science pharmaceutique, université de Bruxelles, 2008.

[13] Miri F, Enregistrement d'un médicament générique fabriqué en Algérie. Université de Tlemcen, 2014.

[14] Code de la santé publique, 19ème édition. Paris. Edition Dalloz, 2005.

[15] La Rédaction Médisite, https:// www.medisite.fr/ d-médicaments-génériques. 17/02/2015.

[16] Mahdi F, cours « Pharmacie galénique », Université de L'arbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi-Algérie, 2019.

[17] Belbacha S, L'eau, validation et qualification d'une unite forme liquide, Mémoire de Master, Université de Badji Mokhtar- Annaba- Algérie, 2019.

[18] Karai B, Hamoudi N. Procédé de fabrication et contrôle de qualité d'un sirop "ENCOFLUIDE® Adulte 180 mg " du groupe pharmaceutique SAIDAL », Mémoire de Master, Université L'arbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi- Algérie, 2018/2019.

[19] Louaar S, Hadjadj H, « Procédé de fabrication et contrôle de qualité d'un sirop "SULPUREN®0,5%" du groupe pharmaceutique SAIDAL », Mémoire de Master, Université L'arbi BenM'hidi Oum El Bouaghi- Algérie, 2019/2020.

[20] Kang, L., H. Jun, and J. McCall, Physicochemical studies of lidocaine–menthol binary systems for enhanced membrane transport. International journal of pharmaceutics, 2000, 35-42.

[21] Bianchetti, A. Maîtrise Universitaire en Pharmacie Travail Personnel de Recherche, Evaluation de l'acceptabilité des formulations de calcium et vitamine D par des enfants. Genève. 2009.

[22] Ouahab A, cours « Les formes pharmaceutiques destinées à la voie orale », Pharmacie galénique,Université de Batna 2- Algérie, 2015.

[23].https://www.fourni-labo.fr/fabrication-de-sirop.

[24].Ait Fella Dj, Ait Issad A, Caractérisation et optimisation de la formulation d'un sirop pharmaceutique à bas d'extrait de thym : extraction et caractérisation de l'HE de thym, Mémoire de Master, Université Mouloud Maamri de Tizi – Ouzou - Algérie, 2017.

[25] Salghi, R. Cours d'analyses physico-chimiques des denrées alimentaires II, GPEE, ENSA Agadir. Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir, 2004.,p 7

[26] Larpent, GM. and Sanglier, JJ. Biotechnologies. Principes et méthodes, 1992, 574-58.

[27] Priestle, YP. A sterea cartoon-drawing program for proteins. Journal of Applied Crystallography, 1988, 21 :472-576.

[28] Nouadri, T. L'α-amylase de *Penicillium camemberti* PL21:Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation .Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. 2011, p.160.

[29] Nakatani, H. Ronte carlo stimulation of multiple attack mechanism of α- amylase. Biopolymers. 1996, 39 (5), p:665-669.

[30] Bhella, RS., Altossar, I. Translational control of α-amylase gene expression in *Aspergillus awamori.* Biotechnology and Applied Biochemistry. 1987, 9 :287-293.

[31] Ziane Bouziane, F., Lachemi Ben Bokréta, I. Etude de la contamination au cours de la fabrication du sirop Ximalex Mémoire de Fin d'Etudes Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana. 2015.

[32] Pradeau, D., Hamon, M. Le contrôle de qualité en milieu hospitalier. - Rôle du pharmacien. Techniques Hospitalières, 1983, 451, 38-41

[33] Guide de bonnes pratiques de fabrication production pharmaceutique. Ministère des Affaires Sociales et de la Solidarité Nationale Secrétariat d'état chargé de la Santé Fascicule spécial 85-19 bis, 1985, Paris.

[34] Gwenola, B., Jean-Louis, B. Méthodes instrumentales d'analyse chimique. France : Lavoisier, 2011.

[35] Hollerf, J. Principe d'analyse instrumentale. http://www.rh. 04/04/2016.