APPROCHE GENERALE DU TRAITEMENT DES DONNEES D'ETUDES DE STABILITE SUR LES SUBSTANCES MEDICAMENTEUSES

Issa T. SOME* ; Philippe BOGAERTS***; Longin SOME* ; Raymond HANUS*** ; M. HANOCQ** ; Pierre I GUISSOU* et Jacques DUBOIS**

**Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté des Sciences de la Santé ; Université de Ouagadougou, BP 7021 Ouagadougou, Burkina-Faso*
***Laboratoire de Chimie Bioanalytique, de Toxicologie et de Chimie Physique appliquée, Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 205/1; Boulevard du triomphe, B-1050 Bruxelles*
****Service d'Automatique et d'Analyse des systèmes Faculté des Sciences appliquées, Université Libre de Bruxelles, CP 165/55, Avenue F.D. Roosevelt 50, B-1050 Bruxelles ;*

(Reçu le 24 – 07 - 2000 – Accepté le 27 – 02- 2001)

Summary We introduce in this paper a general method that improve statistics in drug stability parameter estimation (temperature stability, pH-profile, pH and temperature combined studies). A one step non-linear model that takes into account the errors in drug content determination for the parameter estimation is proposed in all cases.

The proposed method allows the estimation of stability parameters in a single run. It also includes the experimental initial drug contents, where j is the index of a given experiment.

This approach that takes into account all relevant experimental information for the estimation of kinetic parameters is more rigorous in statistical viewpoint than the classical stepwise methods. Kinetic data from acetylsalicylic acid (ASA) hydrolysis are used for the tests.

Key Words : Acetylsalicylic Acid ; Stability , pH-profile ; Non-linear fitting ; Simplex algorithm.

I - INTRODUCTION

Les études de stabilité des substances médicamenteuses constituent une partie importante des informations à fournir avant la mise sur le marché d'une forme pharmaceutique. Elles permettent d'une part de fixer les dates de péremption des substances médicamenteuses et d'autre part de comprendre les mécanismes de dégradation du principe actif permettant ainsi le choix des meilleures conditions de conservation.

La plupart des substances médicamenteuses en solution aqueuse subissent des réactions d'hydrolyse. Il existe d'autres processus de dégradation tels que les réactions d'oxydoréduction, de photo-dégradation, etc.

L'étude des réactions d'hydrolyse sur les principes actifs se fait soit à pH constant (étude de stabilité en fonction de la température), soit à température constante (étude de stabilité en fonction du pH). Les études de stabilité en fonction du pH se font généralement à la température ordinaire (25°C dans l'Union Européenne). Lorsque les substances médicamenteuses sont très stables à température ordinaire, les constantes k_i sont déterminées à des températures élevées [1, 2, 3, 4 et 5]. Les aspects pratiques des études de stabilité accélérées sont présentés dans diverses publications [6, 7].

Les paramètres déterminés (énergies d'activations E_a et temps de péremption t_y, les constantes cinétiques spécifiquesk_i) ne sont alors valables que pour les conditions opératoires choisies.

En général, les traitements des données d'études de stabilité sur les substances médicamenteuses sont entrepris de manière séquentielle. L'influence de la température sur les vitesses d'hydrolyse est étudiée en calculant les constantes cinétiques observées k_{obs}à chaque température et en ajustant ces constantes à l'équation d'Arrhenius sous différentes formes. Dans le cas de l'étude de l'influence du pH, on détermine également les constantes cinétiques k_{obs} à chaque pH et après avoir identifié la meilleure équation liant les constantes cinétiques k_{obs}

observées aux différents pH, on estime les constantes cinétiques spécifiques catalytiques ou non-catalytiques k_i en utilisant divers ajustements linéaires ou non-linéaires.

Peu de méthodes satisfaisantes sont proposées pour l'estimation des paramètres cinétiques spécifiques de l'influence du pH à température basse à partir de données d'études à température élevées.

La plupart des méthodes d'estimation paramétrique procèdent ainsi par étape et les erreurs sur les paramètres estimés dans une étape ne sont pas prises en compte dans l'étape suivante aboutissant ainsi à des paramètres finaux biaisés. Or, une bonne interprétation des résultats obtenus suppose une bonne estimation paramétrique.

Nous avons proposé des approches plus rigoureuses d'estimation paramétrique d'une part lors des études de stabilité en fonction de la température [8] et d'autre part en fonction du pH [9].

Cet article montre que cette approche est générale et peut être utilisée pour l'estimation des paramètres cinétiques spécifiques de l'influence du pH à température basse à partir de données d'études à température élevées.

II - APPROCHES CLASSIQUES DU TRAITEMENT DES DONNEES D'ETUDES DE STABILITE SUR LES SUBSTANCES MEDICAMENTEUSES

L'équation générale de vitesse de l'hydrolyse d'une substance médicamenteuse peut s'exprimer d'une façon générale, pour une cinétique réactionnelle de pseudo-premier ordre et pour un système fermé, par l'expression :

$$\frac{-d[A]}{dt} = k_{obs}(T, pH, \mu, P\ldots)[A] \qquad (1)$$

où la constante cinétique k_{obs} est une fonction de différentes variables (température, pH force ionique μ, pression P, etc.) [10,11]. L'intégration de cette expression aboutit aux différentes équations et ce, en fonction des différentes variables (équation d'Arrhenius lorsque k_{obs} est une fonction de la température, équations prenant en compte l'influence du pH, etc.). Ces différentes équations permettent alors l'identification des paramètres pouvant expliquer le phénomène étudié.

2.1 - Etude de stabilité en fonction de la température

Le traitement des données d'études de stabilité dites "accélérées" se fait par l'utilisation de l'équation d'Arrhenius sous différentes formes. Ces études de stabilité accélérées permettent de déterminer les dates de péremption dans un temps relativement court et de coût peu onéreux comparé aux études en temps réels. Le temps de péremption est défini comme le temps nécessaire pour qu'une substance active atteigne 90% de sa concentration ou de sa quantité initiale lorsqu'elle se dégrade.

L'utilisation de l'équation d'Arrhenius à la détermination des dates de péremption a été introduite par Garrett [12]. Cette méthode d'identification paramétrique procède par trois étapes :

1. La détermination de la constante cinétique $k_{(pK,T)}$ à un pH choisi et ce, pour chaque température élevée étudiée. Pour une cinétique de

premier ordre, la relation est :

$$lnC = lnC_0 - k_{(pH,T)}t \qquad (2)$$

2. L'utilisation de l'équation d'Arrhenius (équation 3) sous sa forme linéaire permet l'estimation des paramètres de stabilité (l'énergie d'activation E_a , et le facteur de fréquence **A**) par la méthode des moindres carrés.

$$lnk_{(pH,T)} = lnA - (E_a/RT) \qquad (3)$$

où R est la constante des gaz parfaits.

3. Les paramètres (E_a , A) ainsi déterminés permettent à l'aide de l'équation (3) de calculer le temps de péremption correspondant à la température d'extrapolation (T_X) selon une technique bien connue [12].

Les insuffisances de cette approche linéaire non pondérée ont été soulignées par de nombreux auteurs [13, 14, 15 et 16]. Des approches linéaires utilisant une pondération des constantes cinétiques déterminées dans les étapes précédentes sont proposées par Davies et Hudson [16], et par Yang et coll. [17]. Une approche bayésienne de la prédiction de la date de péremption est introduite par Su et coll. [18].

Diverses méthodes non-linéaires ont permis également ces estimations paramétriques [18, 19]. Les équations proposées par King et coll. [19] permettent une estimation directe des paramètres de stabilité (E_a , et le temps de péremption t_Y) à partir des données expérimentales. Elle ne prenait cependant pas en compte, les variabilités dans les conditions initiales expérimentales dans l'estimation paramétrique. Des formes plus générales de ces équations sont proposées par Some et coll. [8]. Pour des cinétiques réactionnelles de pseudo-premier ordre et d'ordre zéro, les équations s'écrivent respectivement :

$$C = C_0 \exp\left\{-t \ln(100/Y)/t_Y . \exp\left[(E_a/R)(1/T_X - 1/T)\right]\right\} \quad (4)$$

$$C = C_0\left\{1 - t\left[\left(\frac{1-(Y/100)}{t_Y}\right)\right]\exp\left[(E_a/R)(1/T_X - 1/T)\right]\right\} \quad (5)$$

où C est la concentration mesurée au temps t et C_0 est la concentration initiale expérimentale.

En ce qui concerne les cinétiques de second ordre,

Si $C_0^A = C_0^B = C_0$ (concentrations initiales à l'instant $t = 0$), alors

$$C = \frac{C_0}{1 + \left[t\frac{((100-Y)/Y)}{t_Y}\right]\exp\left[(E_a/R)(1/T_X - 1/T)\right]} \quad (6)$$

Si $C_0^A \neq C_0^B$, l'équation s'écrit :

$$D = D_0 \exp\left\{(t/t_{\frac{X}{Y}})\exp[E_a/R)(1/T_X - /T)]\right\}\frac{Z}{Y-Z} \quad (7)$$

où $D = C^A / C^B$ et $D_0 = C_0^A / C_0^B$

Z et (Z-Y) étant les pourcentages de dégradation de C_0^A et de C_0^B respectivement.

Y est le pourcentage de substance active restant.

Ces modèles permettent donc à l'utilisateur de fixer la température d'extrapolation choisie et le pourcentage (Y) de substance active restant.

L'identification de telles équations nécessite des techniques de programmation et des outils informatiques performants.

Il existe d'autres approches des études de stabilité accélérées qui utilisent une variation de la température au cours de l'étude et des équations

appropriées permettent l'estimation des paramètres de stabilité [20, 21]. Ils sont cependant très imprécis.

II.2. Etude de stabilité en fonction du pH

Les études de stabilité en fonction du pH permettent d'étudier les mécanismes de dégradation des substances médicamenteuses et le choix des meilleures conditions de formulation et de conservation des préparations galéniques. Il s'agit à partir des données expérimentales, de formuler un modèle permettant d'expliquer la dégradation de la substance active. La détermination des paramètres procède par différentes étapes :

1 - La détermination des constantes cinétiques k_{obs} à chaque pH en utilisant les équations des cinétiques réactionnelles appropriées (cinétique d'ordre zéro, un ou deux)

2 - La recherche de la meilleure équation qui relie les constantes cinétiques k_{obs} aux différents pH.

3 - L'identification de ces différentes équations permet d'estimer les paramètres cinétiques du modèle (constantes catalytiques ou non-catalytiques et constantes de dissociation).

Plusieurs types d'équations décrivent l'influence du pH sur les cinétiques réactionnelles. En fonction du nombre d'équilibres protolytiques (0,1,2 ou 3) en solution aqueuse, la constante d'hydrolyse observée k_{obs} est liée au pH, respectivement par les équations suivantes [22]

$$k_{obs} = k_1[H^+] + k_2 + k_3\frac{1}{[H^+]} \qquad (8)$$

$$k_{obs} = \frac{k_1[H^+] + k_2 + \frac{k_3}{[H^+]} + \frac{k_4}{[H^+]^2}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}} \qquad (9)$$

$$k_{obs} = \frac{k_1[H^+] + k_2 + \frac{k_3}{[H^+]} + \frac{k_4}{[H^+]^2} + \frac{k_5}{[H^+]^3}}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2}} \quad (10)$$

$$k_{obs} = \frac{k_1[H^+] + k_2 + \frac{k_3}{[H^+]} + \frac{k_4}{[H^+]^2} + \frac{k_5}{[H^+]^3} + \frac{k_6}{[H^+]^4}}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2} + \frac{K_{a1}K_{a2}K_{a3}}{[H^+]^3}} \quad (11)$$

Le choix de l'équation doit être en accord avec le nombre d'équilibre protolytique, et ceci n'est possible que si l'on dispose d'un nombre de points expérimentaux suffisant que pour décrire correctement le modèle. En effet, seul un grand nombre de points expérimentaux repartis de manière judicieuse sur un domaine de pH le plus large possible permet d'éviter le choix de modèles inadéquats et des interprétations erronées [22, 23]. Du point de vue expérimental, il est important de contrôler aussi rigoureusement que possible, les variables que sont le pH, la température, la force ionique, etc.

Il existe diverses approches d'identification des équations ci-dessus :

- Les linéarisations séquentielles
- Les approches non-linéaires

Les linéarisations séquentielles sont des méthodes très approximatives dans l'estimation des constantes spécifiques k_i [1, 5].

Les approches non-linéaires [11, 24, 25] sont plus rigoureuses du point de vue statistique mais elles nécessitent également deux étapes et les procédures d'identification des paramètres peuvent parfois présenter des difficultés. C'est ainsi que, lorsque les variations des constantes cinétiques $k_{(T,pH)}$ en fonction du pH sont importantes (cas de l'acide acétylsalicylique), il est très difficile de traiter les données sans une

transformation logarithmique des équations de liaison [2, 5, 9]. Nous avons introduit une nouvelle approche permettant une estimation plus rigoureuse des paramètres cinétiques [9].

Le traitement des données d'études de stabilité sur les substances médicamenteuses peut être abordé de manière identique et en une seule étape. Cette approche a permis de déterminer les paramètres de stabilité dans les études de stabilité en fonction de la température et du pH [8, 26]. Elle est étendue dans le présent article à la détermination directe des constantes cinétiques à température ambiante à partir des données d'études de l'influence du pH à températures élevées.

III - DEVELOPPEMENTS THEORIQUES DE LA METHODE PROPOSEE ET DEFINITION DES FONCTIONS DE COÛT

Considérons un modèle non-linéaire (pour une expérience)

$$C(t_k) = f(\theta, y(t_k), t_k) \qquad (12)$$

où $C(t_k) \in \Re$ est le signal mesuré (dans le cas des études de stabilité, ce signal correspond toujours à la concentration ou à la quantité de substance active) au temps t_k ; $y(t_k) \in \Re^m$ est le vecteur des signaux mesurés au temps t_k ($[T]$, $[pH]$ et $[T,pH]$ et respectivement pour les études de stabilité en fonction de la température, du pH, de la température et du pH simultanément). $\theta \in \Re^n$ est le vecteur des paramètres

$$\left(\hat{\theta} = \left[\hat{t}_y, \hat{E}_a, \hat{C}_{01}, \hat{C}_{02}, \hat{C}_{02} \ldots \hat{C}_{0M}\right] \quad \left[\hat{k}_1, \hat{k}_2, \hat{k}_3, \hat{k}_4, \hat{p}K_a, \hat{C}_{01}, \hat{C}_{02} \ldots \hat{C}_{0M}\right]\right.$$

$$\left[\hat{k}_{1X}, \hat{E}_{01}, \hat{k}_{2X}, \hat{E}_{a2}, \hat{k}_{3X}, \hat{E}_{a3}, \hat{k}_{4X}, \hat{E}_{a4}, \hat{p}K_{aX}, \hat{C}_{01}, \hat{C}_{02} \ldots \hat{C}_{0M}\right]$$

ou respectivement pour les études de stabilité en fonction de la température, du pH, de la température et du pH).

L'estimateur de Markov est donné par

$$\hat{\theta}_M = \underset{\theta}{ArgMin} \sum_{k=1}^{N} \frac{1}{\sigma^2(t_k)} \left(C(t_k) - f(\theta, y(t_k), t_k)\right)^2 \quad (13)$$

Cette expression est statistiquement valable et correspond dans ce cas à l'estimateur du maximum de vraisemblance si et seulement si :

- Les erreurs sont additives uniquement sur les mesures des signaux $C(t_k)$

$$C(t_k) = \overline{C}(t_k) + \varepsilon(t_k) \quad (14)$$

où $\overline{C}(t_k)$ sont les valeurs vraies des concentrations $\varepsilon(t_k)$ et les erreurs de mesures sur ces concentrations.

- Ces erreurs $\varepsilon(t_k)$ sont indépendantes ($E[\varepsilon(t_k)\varepsilon(t_l)] = 0 \quad \forall t_k \neq t_l$), de moyenne nulle et de variance

$\sigma^2(t_k)$: $(E[\varepsilon(t_k)] = 0 \quad \forall t_k \; (E[\varepsilon(t_k)\varepsilon(t_l)] = \delta_{k,l}\sigma(t_k)$

(où $\delta_{k,l}$ est le symbole de Kronecker) ;

- La distribution des erreurs $\varepsilon(t_k)$ est gaussienne.

Si cependant les variances $\sigma^2(t_k)$ sont supposées constantes ($\sigma^2(t_k) = \sigma^2 \; \forall t_{k,l}$), alors l'estimateur de Markov est réduit à un estimateur des moindres carrés

$$\hat{\theta}_{LS} = \underset{\theta}{ArgMin} \sum_{k=1}^{N} C(t_k) - f(\theta, y(t_k), t_k))^2 \quad (15)$$

C'est cet estimateur qui est le plus souvent utilisé dans la littérature.

Cependant deux cas sont à considérer :

1) Si toutes les variances $\sigma^2(t_k)$ sont connues ; l'estimateur de Markov $\hat{\theta}_M$ peut être utilisé. Il consiste alors en la solution d'un problème d'optimisation non-linéaire et les algorithmes numériques d'optimisation (simplex, Gauss-Newton, Levenberg-Marquardt...), sont utilisables. Le choix des estimations initiales est alors important car il détermine la vitesse de la convergence et l'obtention d'un minimum

local ou du *minimum minimorum*, etc. Si cependant une transformation non-linéaire (logarithmique par exemple) permet de rendre le modèle linéaire en ses paramètres), on peut utiliser ce dernier pour l'estimation de la solution unique par la méthode des moindres carrés.

2) Si les variances $\sigma^2(t_k)$ ne sont pas connues, la question est alors de savoir si l'estimateur des moindres carrés est plus approprié dans le cas du modèle non-linéaire ou dans celui de la transformation logarithmique du modèle ? Cela revient à décider si ce sont les erreues absolues ou les erreurs relatives $C(t_k)$qui sont constantes ?

Si les erreurs absolues sont les plus constantes ($\sigma(t_k) \approx$ constant), nous devons utiliser l'estimateur $\hat{\theta}_{LS}$des moindres carrés. Si par contre, les erreurs relatives sont les plus constantes, ($\sigma(t_k)/C(t_k) \approx$ constant), alors l'estimateur des moindres carrés doit être utilisé sur une transformation logarithmique du modèle.

A partir de la fonction de coût des moindres carrés et des paramètres estimés $\hat{\theta}$, la matrice des variances et covariances peut être donnée par l'expression :

$$\hat{E}\left\lfloor \tilde{\theta}\tilde{\theta}^T \right\rfloor \cong \hat{\sigma}^2 P(\hat{\theta}) \tag{16}$$

où $\hat{E}\left\lfloor \tilde{\theta}\tilde{\theta}^T \right\rfloor$est l'estimée de l'espérance mathématique de l'erreur paramétrique $\tilde{\theta} = \theta - \hat{\theta}$.

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{J(\hat{\theta})}{\sum_{j=1}^{M} N_j - \dim(\theta)} \tag{17}$$

est l'estimée de la variance des mesures.

$$P^{-1}(\hat{\theta}) = \sum_{j=1}^{M}\sum_{i=1}^{N}(J_{ij})(J_{ij})^{T} \qquad (18)$$

est la matrice de sensibilité du modèle par rapport aux paramètres où

$$J_{ij} = \frac{df(y(t_k);\theta)}{d\theta}\Big|\theta = \hat{\theta} \qquad (19)$$

Les paramètres des différents modèles sont estimés à l'aide de l'algorithme d'optimisation non-linéaire du simplexe [26] sous un environnement Matlab (version 4.1)

IV - APPLICATIONS AUX TRAITEMENTS DES DONNEES D'ETUDES DE STABILITE SUR L'ACIDE ACETYLSALICYLIQUE

L'acide acétylsalicylique en solution subit une réaction d'hydrolyse selon une cinétique de pseudo-premier ordre pour donner l'acide salicylique et l'acide acétique. Le modèle correspondant dans le cas des études de stabilité en fonction de la température est donné par l'équation (4). Pour les études de stabilité en fonction du pH, l'équation (9) explique le mieux la cinétique d'hydrolyse (une constante protolytique).

Les études consistent à déterminer les concentrations de principes actifs au cours des réactions d'hydrolyse de l'acide acétylsalicylique en fonction de la température pour des solutions de pH définis. L'étude a porté sur quatre températures (298,16°K, 310,16°K, 318,16°K et 328,16°K) et 18 pH allant de 0,94 à 12,55.

L'équation générale utilisée est l'expression d'une cinétique de pseudo-premier ordre :

$$C = C_0\, exp(-k_{obs}\, t) \qquad (20)$$

où k_{obs} est donnée dans l'expression de l'équation (4) pour les études de stabilité en fonction de la température, par l'équation (9) pour l'étude

de stabilité en fonction du pH et l'équation (23) pour les études de stabilité en fonction de la température et du pH

4.1 - Etudes de stabilité en fonction de la température

A partir des hypothèses suivantes :

- Les erreurs sur les mesures du temps et de la température sont considérées comme négligeables.
- Les erreurs sur les mesures des concentrations sont indépendantes, avec une distribution gaussienne de moyenne nulle et de variance σ^2 ,

on peut écrire la fonction de coût des moindres carrés selon l'expression

$$J(\theta) = \sum_{j=1}^{M} \sum_{i=1}^{N_j} (C_{ij}(t_{ij}, T_j) - f(C_{ij}, t_{ij}, T_j; E_a, t_Y, C_{0j}))^2 \quad (21)$$

où $\theta = [t_Y, E_a, C_{01}, \ldots C_{0M}]$ est le vecteur des paramètres, M est le nombre d'expérience, N_j est le nombre de mesures dans une expérience j, C_{ij} est la concentration mesurée et $f(C_{ij}, t_{ij}, T_j; E_a, t_Y, C_{0j})$ est le modèle donné par l'équation (4).

L'identification de ce modèle pour des données de cinétique d'hydrolyse à 308.16°K, 318,16°K, 328,16°K et 333,16°K donnent les résultats présentés au tableau I.

Cette approche d'identification paramétrique permet outre l'estimation des paramètres de stabilité (t_Y, E_a), de retrouver à partir des données expérimentales, les valeurs les plus vraisemblables des concentrations initiales utilisées pour les réactions d'hydrolyse (Tableau I). Elle permet de traiter les données provenant d'analyses où les concentrations initiales sont statistiquement différentes (Tableau II).

TABLEAU I : *Paramètres de stabilité et concentrations initiales identifiés par la méthode : les concentrations initiales sont similaires* [8]

Paramètres	Valeurs initiales θ_0	Estimées finales $\hat{\theta}$	Ecarts-types de l'erreur d'estimation
t_{so}(h)	10	5,4	0,3
Ea(cal/mole)	16000	14297	358
c_{01}*	5,57	5,8	0,1
c_{02}	5,57	5,8	0,1
c_{03}	5,57	5,7	0,1
c_{04}	5,55	5,9	0,1
c_{05}	5,55	5,9	0,1
c_{06}	5,55	5,9	0,1
c_{07}	5,57	5,8	0,1
c_{08}	5,58	5,8	0,1
c_{09}	5,57	5,7	0,1
c_{010}	5,60	5,6	0,2
c_{011}	5,60	5,7	0,2
c_{012}	5,60	5,6	0,2
$J(\hat{\theta}) \times 10^{-10}$	37,41	2,474	

*Concentration unit (10^{-3} M)

TABLEAU II : *Paramètres de stabilité et concentrations initiales identifiés par la méthode: les concentrations initiales sont différentes* [8]

Paramètres	Valeurs initiales θ_0	Estimées finales $\hat{\theta}$	Ecarts-types de l'erreur d'estimation
t_{so}(h)	10	5,4	0,2
Ea(cal/mole)	16000	14251	366
c_{01}*	2,79	2,91	0,09
c_{02}	2,79	2,90	0,09
c_{03}	2,79	2,86	0,09
c_{04}	2,78	2,93	0,09
c_{05}	5,55	5,9	0,1
c_{06}	5,55	5,9	0,1
c_{07}	2,79	2,88	0,09
c_{08}	5,58	5,81	0,09
c_{09}	5,57	5,66	0,09
c_{010}	2,80	2,8	0,1
c_{011}	5,60	5,7	0,1
c_{012}	5,60	5,5	0,1
$J(\hat{\theta}) \times 10^{-10}$	27,85	1,402	

*Unités des concentrations (10^{-3} M)

4.2 - Etudes de stabilité en fonction du pH

L'équation expliquant l'influence du pH sur la cinétique d'hydrolyse de l'acide acétylsalicylique est donnée par de nombreux auteurs [7, 27, 28]. Il faut souligner que si la détermination des constantes cinétiques $\mathbf{k_{obs}}$ à chaque pH est une étape obligatoire pour établir les équations de liaison 8 à 11, celles-ci ne permettent pas toujours une meilleure estimation des paramètres cinétiques. Nous avons proposé une meilleure estimation paramétrique basée sur l'équation suivante et une fonction de coût construite de la même manière que la précédente [25]:

$$C = C_0 \exp\left(-\bar{k}_{(pH,T)} t\right) \qquad (22)$$

où

$$\bar{k}_{(T,pH)} = \frac{k_1 * 10^{(-2pH+pK_a)} + k_2 * 10^{(-pH+pK_a)} + k_4 + k_3 * 10^{(pH+pK_w)}}{10^{(-pH+pK_a)} + 1} \qquad (23)$$

$\bar{k}_{(T,pH)}$ est la constante cinétique observée à un **pH** donné, k_1 est la constante de catalyse acide, $\boldsymbol{k_3}$ est la constante de catalyse, $\boldsymbol{k_2}$ et $\boldsymbol{k_4}$ sont les constantes non-catalytique d'hydrolyse des formes ionisées et non-ionisées de l'acide acétylsalicylique, $\boldsymbol{k_a}$ est la constante de dissociation et $\boldsymbol{k_w}$ est la constante d'auto-protolyse de l'eau à la température de l'étude.

Aussi, en admettant les hypothèses déjà faites, on peut définir la fonction de coût suivante

$$J(\hat{\theta}) = \sum_{j=1}^{M} \sum_{i=1}^{N_j} \left(C_{ij}(t_{ij}, pH_j) - f(C_{ij} t_{ij}, pH_j; k_1, k_2, k_3, k_4, pK_a C_{0j}) \right)^2 \qquad (24)$$

$\theta = [\mathbf{k_1}, \mathbf{k_2}, \mathbf{k_3}, \mathbf{k_4}, \mathbf{pK_a}, \mathbf{C_{01}} \ldots \mathbf{C_{0M}}]$ est le vecteur des paramètres, M est le nombre d'expérience, N_j est le nombre de mesure de l'expérience, C_{ij} est la concentration mesurée et $f(\mathbf{C_{ij}}, \mathbf{t_{ij}}\ \mathbf{pH_j}\ ;\ \mathbf{k_1}, \mathbf{k_2}, \mathbf{k_3}, \mathbf{k_4}, \mathbf{pK_a}, \mathbf{C_{01}} \ldots \mathbf{C_{0M}})$est le modèle donné par l'équation (22).

L'identification de cette équation donne les résultats en tableau III.

TABLEAU III : ***Résultats d'estimation des paramètres cinétiques de l'étude de l'influence du pH sur l'hydrolyse de l'acide acétylsalicylique à 25 °C*** [25].

Paramètres	Valeurs initiales θ_0			Estimées finales $\hat{\theta}$	Ecarts-types de l'erreur d'estimation
	Test 1	Test 2	Test 3		
k_1	2,50	25	0,50	2,34	0,08
k_2	0,20	10	20	0,025	0,002
k_3	5000	1000	100	4965	93
k_4	0,34	0,30	30	0,348	0,004
pKa	3,50	5	2	3,60	0,22
$J(\theta)$	45,6	25,9	31,8	3,96	

Il montre que les valeurs initiales ont peu d'influence sur l'estimation paramétrique (bonne convergence et robustesse de l'algorithme) et les constantes cinétiques sont en accord avec les données de la littérature [27]. Elles sont statistiquement meilleures en raison de la méthode d'estimation paramétrique qui prend en compte toutes les informations issues de l'expérimentation. Les concentrations initiales sont également estimées (résultats non présentés). Les résultats comparatifs avec les méthodes classiques sont publiés par ailleurs [25].

4.3 - Application au traitement des données relatives à l'influence du pH et de la température

Lorsque les substances médicamenteuses sont très stables, les études de stabilité en fonction du pH sont entreprises à températures élevées

et les constantes cinétiques k_i sont déterminées à ces dites températures. Peu de données peuvent être obtenues sur les constantes cinétiques de l'hydrolyse de ces molécules à la température ordinaire.

Pourtant, les informations utiles du point de vue des paramètres de stabilité sont les constantes spécifiques et les paramètres énergétiques (énergies d'activation spécifiques) qui y sont associés, la constante de dissociation (pK_a) de la substance à la température ordinaire ou ambiante et le *pH* maximum de stabilité.

Il va cependant de soi que le formulateur des formes pharmaceutiques optera pour un pH de formulation compatible avec les données physiologiques.

Des tentatives permettant, à partir d'études de l'influence du pH à températures élevées, d'obtenir les constantes cinétiques spécifiques à la température ordinaire, sont alors entreprises. Powell [29] a établi le tracé de l'influence du *pH* sur la cinétique d'hydrolyse de la lidocaïne à 25°C à partir d'études réalisées à température élevées ; l'auteur a mené son étude en deux étapes. Dans la première étape, l'équation d'Arrhenius est utilisée à chaque *pH* pour obtenir par extrapolation la constante cinétique à 25°C. Dans la seconde étape, ces constantes sont utilisées pour calculer les constantes spécifiques k_i à 25°C après une optimisation de l'équation qui les lie aux pH. Alibrandi *et coll.* [6] ont déterminé les constantes cinétiques à un pH et à différentes températures et ce, en une seule analyse. La méthode préconisée permet de déterminer les énergies d'activation en faisant usage d'une forme modifiée de l'équation d'Eyring (une variante de l'équation d'Arrhenius). Cependant, la méthode n'est pas appliquée à l'étude de l'influence du pH à chaque température et à la détermination des constantes cinétiques spécifiques k_i ; l'aspect énergie d'activation spécifique E_{ai} n'est pas abordé.

Les études relatives à la détermination des énergies d'activation spécifiques E_{ai} sont peu documentées. Une des rares études a été menée par Connors [30]. Il s'agit de déterminer les énergies d'activation liées

à une hydrolyse acide-base spécifique. L'approche consiste d'abord à déterminer l'énergie d'activation en milieu acide en ajustant les données à l'équation d'Arrhenius. A l'aide d'une autre équation liant les énergies d'activation spécifiques en milieux acide et basique, on peut ainsi déterminer l'énergie d'activation en milieu basique. Cette méthode n'est cependant applicable qu'à une série limitée de substances. Elle ne peut servir de base à l'estimation des paramètres énergétiques de l'hydrolyse de l'acide acétylsalicylique car des mécanismes cinétiques autres que la catalyse acide-base sont observés. Elle utilise en outre une approche séquentielle dont les inconvénients ont été abordés.

Avec la méthode d'identification générale proposée, on peut à partir des études de l'influence du pH sur les cinétiques réactionnelles effectuées aux températures élevées, déterminer directement les constantes cinétiques spécifiques et les énergies d'activation qui y sont liées et ce, à une température T_X. La relation lie la concentration C, le temps t, la température T et le pH.

Dans cette approche, les constantes cinétiques sont uniquement fonction du pH et de la température. Les autres facteurs sont considérés constants. Les énergies d'activation E_{ai} ne sont pas fonction de la température mais varient avec le ; en considérant également que les constantes spécifiques k_i obéissent à la loi d'Arrhenius. Les erreurs de mesure sur les temps, et celles sur les pH en fonction de la température T ne sont pas prises en compte et l'équation qui lie les constantes cinétiques observées au pH doit être préalablement établie (équations 8 à 11).

Le modèle répond aux équations qui suivent lorsqu'il est appliqué à l'acide acétylsalicylique. Pour une température T donnée, l'équation de l'influence du pH sur la cinétique d'hydrolyse de l'acide acétylsalicylique est décrite par la relation (23) reprise ici pour faciliter la compréhension du raisonnement qui suit

$$k_{(T,pH)} = \frac{(k_{1T}10^{(-2pH+pK_a)}) + (k_{2T}10^{(-pH+pK_a)}) + (k_{4T}) + (k_{3T}10^{(pH-pK_a)})}{10^{(-pH+pK_{aTX})} + 1} \quad (25)$$

D'autre part, on peut écrire en considérant que la relation d'Arrhenius est valide dans le domaine des températures considérées,

$$k_{iT} = k_{iT_X} \exp(E_{ai} / RT_X) \exp(-E_{ai} / RT) \qquad (26)$$

où T_X est la température d'extrapolation [15].

En admettant que la constante de dissociation est indépendante de la température [7]

$$pK_{aT} = pK_{aX} \qquad (27)$$

on peut alors écrire en remplaçant chaque constante k_{iT} de l'équation (25) par leur expression dans l'équation (26) :

$$k_{(pH,T)} = \frac{1}{10^{(-pH+pK_{aTX})}+1} \begin{bmatrix} 10^{(-2pH-pK_{aTX})} k_{1X} \exp[(E_{a1}/R)(1/T_X - 1/T)] \\ 10^{(-pH+pK_{aTX})} k_{2X} \exp[(E_{a2}/R)(1/T_X - 1/T)] \\ +k_{4X} \exp[(E_{a4}/R)(1/T_X - 1/T)] \\ +10^{(-pK_{aTX}-pH)} k_{3X} \exp[(E_{a3}/R)(1/T_X - 1/T)] \end{bmatrix} \qquad (28)$$

où $k_{(pH,T)}$ est la constante cinétique en fonction du pH et de la température.

Comme la réaction de dégradation de l'acide acétylsalicylique est décrite par une cinétique de premier ordre, il est possible d'écrire la relation suivante

$$C = C_0 exp(-k(pH,T)\ t) \qquad (29)$$

Cette équation permet le calcul direct des paramètres de stabilité telles que les constantes spécifiques k_{iTx} , les énergies d'activation spécifiques E_{ai} qui y sont liées, la constante d'acidité pK_{aX} à la température d'extrapolation et les concentrations initiales de chaque expérience et ce, en une seule étape. Les variables indépendantes sont la température T, le pH et le temps t.

A partir des hypothèses faites précédemment, la fonction de coût des moindres carrés est :

$$L(\overline{C}_{ij}) = \sum_{i=1}^{M}\sum_{j=1}^{N}\left(C_{ij} - C_0(i)\exp(-k(pH,T)t)\right)^2 \quad (30)$$

où toutes les variables et paramètres sont déjà définis.

Pour le traitement des données utilisant ce modèle, il faut au minimum deux séries de données issues d'études de l'influence du pH à deux températures différentes. Les données au cours de cette étude ont donc consisté à déterminer les concentrations en fonction du temps pour différents pH à 298,16°K, 310,16°K et 328,16°K.

Pour valider un tel modèle, diverses estimations ont été effectuées à partir de ces données. Le tableau IV montre les résultats d'estimation paramétrique à partir des données obtenues à 298,16°K et 310,16°K. La température d'interpolation est à 298,16°K. Les paramètres cinétiques (constantes cinétiques spécifiques et constantes de dissociation) ainsi que les énergies d'activation ont pu être déterminés en une étape.

TABLEAU IV : ***Résultats obtenus en identifiant les paramètres de l'équation (29) sur la base de données de l'hydrolyse de l'acide acétylsalicylique à 298,16°K et 310,16°K -. La température d'interpolation est 298,16°K.***

Paramètres	Valeurs initiales θ_0	Estimées finales $\hat{\theta}$	Ecarts-types de l'erreur d'estimation
k_1 (l^{-1} M^{-1})	2,5	2,58	0,06
Ea_1 (cal. /mole)	19000	12635	598
k_2 (l^{-1})	0,02	0,020	0,001
Ea_2 (cal. /mole)	18000	26770	1090
k_3 (l^{-1} M^{-1})	5000	4865	92
Ea_3 (cal. /mole)	12000	12692	424
k_4 (l^{-1})	0,3	0,343	0,003
Ea_4 (cal. /mole)	17000	16843	211
pK_a	3,5	3,55	0,16
$\Lambda(\hat{\theta})\times10^{-10}$	75	7,66	

Un second test d'interpolation a consisté à rechercher les paramètres cinétiques à une température située entre les deux températures d'acquisition des données. Les résultats pour une température d'extrapolation 310,16°K sont présentés au tableau V pour les données acquises à 298,16°K et 328,16°K.

TABLEAU V : ***Résultats obtenus en identifiant les paramètres de l'équation (29) sur base des données de l'hydrolyse de l'acide acétylsalicylique à 298,16°K et 328,16°K. La température d'extrapolation est 310,16°K***

Paramètres	Valeurs initiales θ_0	Estimées finales $\hat{\theta}$	Ecarts-types de l'erreur d'estimation
k_1 ($h^{-1}M^{-1}$)	0,25	0,295	0,009
Ea_1 (cal /mole)	19000	15400	374
k_2 (h^{-1})	0,004	0,0029	0,0004
Ea_2 (cal /mole)	20000	19934	715
k_3 ($h^{-1}M^{-1}$)	200	216	5
Ea_3 (cal /mole)	12000	15374	294
k_4 (h^{-1})	0,03	0,0426	0,0006
Ea_4 (cal /mole)	16000	16762	125
pK_a	3,5	3,58	0,34
$J(\theta)\times10^{-10}$	95	16,87	

Ce modèle a permis également d'obtenir les paramètres cinétiques à des températures d'extrapolation sortant du champs expérimental.

Ainsi, le tableau VI présente les résultats des paramètres à 293,16°K et à 283,16°K pour des données acquises à 298,16°K et 310,16°K.

TABLEAU VI : ***Résultats obtenus en identifiant les paramètres de l'équation (29) sur base des données de l'hydrolyse de l'acide acétylsalicylique 298,16°K et 310,16°K. Extrapolation à 293,16°K.***

Paramètres	Valeurs initiales θ_0	Estimées finales $\hat{\theta}$	Ecarts-types de erreur d'estimation
k_1 (J^{-1} M^{-1})	1,4	1,79	0,06
Ea_1 (cal. /mole)	16000	12639	597
k_2 (J^{-1})	0,02	0,0091	0,0009
Ea_2 (cal. /mole)	16000	26770	1090
k_3 (J^{-1} M^{-1})	6000	5001	143
Ea_3 (cal. /mole)	12000	12670	424
k_{ex}(J^{-1})	0,3	0,211	0,003
Ea_4 (cal. /mole)	16000	16848	211
pK_a	3,5	3,55	0,16
$J(\theta)\times10^{-10}$	152	7,66	

L'analyse des résultats révèle que les constantes cinétiques spécifiques k_{IX} obtenues sont similaires à celles obtenues dans les études de stabilité en fonction du pH (comparaison des résultats des tableaux III et IV). Les énergies d'activation ne varient pas en fonction de la température, ce qui vérifie l'hypothèse faite a priori.

Il a donc été possible, à partir des données cinétiques de l'hydrolyse d'une substance en fonction du pH à températures élevées, d'obtenir par extrapolation les valeurs des constantes cinétiques spécifiques à basses températures. Il est à remarquer que l'hypothèse faite sur les valeurs des constantes de dissociation est vérifiée par les résultats expérimentaux. Les valeurs calculées de cette constante aux différentes températures ne varient pas avec la température d'extrapolation. Cependant, cette constatation est en contradiction avec la loi de Van'Hoff qui donne l'influence de la température sur la constante de dissociation. Ceci nous a amené à envisager le traitement de l'équation

(29) afin cette fois de déterminer les paramètres cinétiques et la variation d'énergie libre de dissociation (ΔG) de la réaction.

Une modification de l'équation (29) est faite de la manière suivante :

$$pK_a = \frac{\Delta G}{\ln(10)\mathrm{RT}_X} \qquad (31)$$

En substituant la valeur du pKa dans l'équation (28) par son expression donnée par l'équation (31), on peut calculer la variation d'énergie libre de dissociation de la molécule à la température d'extrapolation T_X. L'équation 28 devient :

$$k_{(pH,T)} = \frac{1}{10^{\left(pH + \frac{\Delta G}{\ln(10)RT_X}\right)} + 1} \cdot \left\{ \begin{array}{l} 10^{\left(2pH + \frac{\Delta G}{\ln(10)RT_X}\right)} k_{1X} \exp\left[(E_{a1}/R)(1/T_X - 1/T)\right] \\ 10^{\left(-pH + \frac{\Delta G}{\ln(10)RT_X}\right)} k_{2X} \exp\left[(E_{a2}/R)(1/T_X - 1/T)\right] \\ + k_{3X} \exp\left[(E_{a4}/R)(1/T_X - 1/T)\right] \\ + 10^{(-pK_{a1} + pH)} k_{3X} \exp\left[(E_{a5}/R)(1/T_X - 1/T)\right] \end{array} \right\} \qquad (32)$$

On aboutit ainsi à une équation identique à l'équation 30 où $k(pH,T)$ est donné par l'équation (32).

$$C = C_0 \exp\left(-k(pH,T)t\right) \qquad (33)$$

Les paramètres cinétiques estimés par cette équation sont identiques à ceux de l'équation précédente (résultats non présentés). Cette similarité entre les paramètres est d'ailleurs normale. Les deux équations ne diffèrent que par l'expression d'un paramètre. L'énergie libre de dissociation présente une moyenne de 4809 calories par mole et une dispersion de plus ou moins 56 calories par mole sur sept tests d'extrapolation réalisés sur différentes séries de données. La détermination de l'énergie libre de dissociation permet de déterminer plus exactement les constantes de dissociation à différentes températures en ajustant les données à la relation 31. Le tableau VII présente ainsi la valeur des constantes de dissociation aux températures étudiées. Ces valeurs sont

en parfaite concordance avec les données de la littérature [31].

TABLEAU VII : ***Constantes de dissociation de l'acide acétylsalicylique en fonction de la température***

Température (°K)	pKa
328,16	3,20
318,16	3,30
310,16	3,39
298,16	3,53
293,16	3,59
283,16	3,71

V - CONCLUSION

L'approche générale proposée dans ce travail permet d'aborder le traitement des données d'études de stabilité de manière identique aussi bien dans les études de stabilité en fonction de la température que du pH. Elle permet surtout l'estimation des paramètres de stabilité à la température ambiante à partir d'études de stabilité aux températures élevées. Dans tous les cas, les concentrations initiales sont estimées.

Contrairement aux approches séquentielles, les erreurs sur les paramètres estimés ne sont que le reflet des erreurs de mesures sur les signaux analytiques donnant ainsi des résultats statistiquement meilleurs.

Cependant, comme dans toute étude, l'exactitude et la précision des paramètres est fonction de la qualité des résultats analytiques, qualité liée à différents facteurs. Une attention particulière doit être accordée à la mise au point de la méthode analytique, d'une manière générale,

au plan expérimental. Les variables (pH, température et temps) doivent être contrôlées rigoureusement. Les données doivent suffisamment décrire le modèle, de manière à permettre une estimation correcte de chaque paramètre.

Un programme informatique basé sur les différentes équations permet de traiter l'essentiel des données d'étude de stabilité pour les substances dont les cinétiques de dégradation sont de pseudo-premier ordre.

BIBLOGRAPHIE

[1] - ZOUR, E. LODHI, S.A. NESBITT, R.U. SILBERING, S.B. and CHATURVEDI, P.R., *Pharmaceutical Research* (1992) 9(5), 595-600.

[2] - WON, C.M., *Pharmaceutical Research* (1992) 9(1), 131-137.

[3] - BRANDL, M. STRICKLEY, R. BREGANTE, T. GU, L. and CHAN, T.W., *International journal of pharmaceutics* (1993) 93, 75-83.

[4] - DIMITROVSKA, A. STOJANOSKI, K and DOREVSKI, K., International journal of pharmaceutics (1995) 115, 175-182.

[5] - RAGHAVAN, K.S. GRAY, B.D. SCHOLZ, T.H NEMETH, G.A. and HUSSAIN, M.A., *Pharmaceutical Research*, (1996) 13(12), 1815-1820.

[6] - BENTEJAC R., BEAUTEMPS, R., BOSTSARRON A.M., BRUYNINCKX, M., CAPORAL-GAUTHIER, J et autres; SFSTP S.T.P. *Pharma Pratiques* (1991) 1 (1), 11-24

[7] - J.T. CARSTENSEN, *Drug stability: Principles and Practices. Drugs and Pharmaceutical Sciences, vol. 43*. Marcel Dekker, Inc., 1990, New York, USA.

[8] - SOME T.I.; BOGAERTS P; DUBOIS, J. ; HANUS R. and HANOCQ M.. *International journal of pharmaceutics*, (1999) 184, 165-172.

[9] - SOME T.I.; BOGAERTS P; DUBOIS, J. ; HANUS R. and HANOCQ M. *International journal of pharmaceutics*, (2000) 198, 39-49

[10] - ALIBRANDI, G. MICALI, N. TRUSSO, S. and VILLARI, A. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1996) 85(10), 1105-1108.

[11] - ZHOU, M. and NOTARI, R.E, *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1995) 84(5), 534-538.

[12] - GARRETT, E.R., J. Am. Chem. Soc., (1957) 79, 3401-3408.

[13] - BENTLEY, D.L., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1970) 59(4), 464-467.

[14] - KIRKWOOD, T.B.L.,. *Biometrics,* (1977) 33, 736-742.

[15] - DAVIES, O.L. and BUDGETT, D.A.,. *J. Pharm. Pharmacol.*, (1980) 32, 155-159.

[16] - O.L. DAVIES,. and H.E. HUDSON, *Stability of drugs : Accelerated storage tests.* In Buncher, C.R. and Tsay, , *Statistics in the pharmaceutical industry.* Statistics J-Y. (Ed.) (1994) New-York. Basel.

[17] - YANG, W-H., *Drug development and industrial pharmacy.* (1981) 7(1), 63-77.

[18] - SU. X-Y. PO, A.L.W.P. and YOSHIOKA. S., *Pharmaceutical Research*, (1994) 11(10), 1462-1466.

[19] - KING, S-Y.P KUNG, M. and FUNG. H-L., Journal of Pharmaceutical Sciences, (1984) 73(5), 657-662.

[20] - YOSHIOKA, S. ASO, Y. and UCHIYAMA, M., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1987) 76(10), 794-798.

[21] - YOSHIOKA, S ASO, Y. and UCHIYAMA, M.. *International journal of pharmaceutics*, (1988) 46, 121-132.

[22] - VAN DER HOUWEN, A.O.G.J DE LOOS, M.R. BEIJNEN, J.H BULT, A. and UNDERBERG, W.J.M. (1997). International journal of pharmaceutics, (1997) 155, 137-152.

[23] - VAN DER HOUWEN, O.A.G.J. BEIJNEN, J.H. BULT, A. and UNDERBERG, W.J.M., *International journal of pharmaceutics*, (1988) 45, 181-188.

[24] - VALCARCE, R. and SMITH, G.G, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, (1992) 16, 61-68.

[25] - SKWIERCZYNSKI, R.D. and CONNORS, K.A , *Pharmaceutical Research*, (1993) 10(8), 1174-1180.

[26] - NELDER, J.A. and MEAD, R. (1965).- *Computer Journal*, (1965) 7, 308-313.

[27] - K.A. CONNORS, *Reaction mechanism in organic analytical chemistry*. Jonh wiley & Sons, (1973) New-York. 634 p.

[28] - CONNORS, K.A. (1981).- *The study of reaction kinetics. Journal of Parenteral Science and Technology*, 35(4), 186-211.

[29] - POWELL, M.F., *Pharmaceutical Research*, (1987) 4(1), 42-45.

[30] - CONNORS, K.A. *Journal of Parenteral Science and Technology*, (1982) 36(5), 205-209.

[31] - K.A. CONNORS, G.L. AMIDON, and V.J. STELLA, *Chemical Stability of Pharmaceuticals : A Handbook for Pharmacists*. John Wiley & sons, (1986) USA