

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA -1-

Faculté de Technologie

Département de génie des procédés

THESE DE DOCTORAT

En Chimie Industrielle

ETUDE DES INTERACTIONS CONTENU-CONTENANT :
MATIERES PLASTIQUES - PRODUITS PHARMACEUTIQUES

Par : **Zohra HANED née AIT MESBAH**

Devant le jury composé de :

H. BOUTOUMI	Professeur, U. Blida 1	Président
R. ISSAADI	Professeur U. Blida 1	Examineur
N. BELHANECHÉ	Professeur ENP, Alger	Examineur
S. KADDOUR	Professeur U.STHB	Examineur
A. BOUDIS	Pharmacien MC-A faculté d'Alger	Examineur
M. FERKIOUI	Pharmacien IMC Rouiba	Invité
S. MOULAY	Professeur U. Blida 1	Directeur de thèse

Blida, septembre 2019

RESUME

L'objectif de la présente étude est de proposer une méthodologie analytique pour évaluer les phénomènes d'interaction contenu-contenant entre les produits pharmaceutiques et le conditionnement plastique; des procédés d'extraction des plastifiants et en particulier le Diéthylhexyle phtalate (DEHP) à partir du chlorure de polyvinyle (PVC) efficaces et des méthodes d'analyses fiables sont appliqués pour déterminer :

- le taux de DEHP dans le matériau en PVC plastifié au DEHP à usage parentéral et vérifier son absence dans le PVC déclaré sans phtalates,
- le taux de plastifiants, cinq phtalates, un adipate, deux alkylphénols et la benzophénone dans les solutions aqueuses pour perfusion conditionnées dans des poches plastiques.

Dans le matériau en PVC plastifié au DEHP, la teneur de ce phtalate, déterminée par spectrométrie UV et par HPLC est inférieure à 40%, ce qui est conforme aux exigences de la pharmacopée européenne ; son absence a également été confirmée dans le nouveau matériau en PVC sans phtalates.

Dans les solutions aqueuses pour perfusion conditionnées dans des poches en PVC plastifié, seul le DEHP a été détecté par GC-MS à des taux de $4,31 \pm 0,5 \mu\text{g/L}$ (NaCl 0,9%) et $4,29 \pm 0,25 \mu\text{g/L}$ (glucose à 5%) dans des poches nouvellement fabriquées alors que les niveaux ont augmenté de 10 fois dans les lots périmés (durée de trois ans.de conservation).

Dans la multicouche (composée de polyéthylène PE/ polyamide PA/ polypropylène PP), le DEHP n'a pas été mis en évidence mais deux plastifiants, le dibuthylphthalate (DBP) et le diéthylphtalate (DEP) ont été détectés à des taux de $0,7 \pm 0,1$ et $4,14 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$, respectivement. Ces plastifiants ne sont pas mentionnés en tant qu'additifs autorisés dans les matériaux destinés à une utilisation parentérale. En outre, d'autres composés comme le Caprolactame (monomère de la couche intermédiaire en PA) et un produit de dégradation de l'Irgaphos (un antioxydant des polyoléfinés PE et PP) sont identifiés dans les sérums par GC-MS grâce à la librairie X-Calibur. La performance de la méthodologie proposée a démontré un relargage d'additifs de matières plastiques à des taux faibles mais non négligeables, ce qui peut constituer un risque pour le malade en cas de perfusions réitérées.

Par ailleurs, l'application directe de la spectrométrie à transformée de Fourier FTIR sur des blisters en PVC récupérés à partir de lots de comprimés conservés durant une période de 3 ans, a démontré une faible variation dans les spectres obtenus. Cette méthodologie très simple peut être adoptée lors des études de stabilité pour renseigner sur d'éventuels phénomènes d'interaction contenu-contenant.

Mots-clés : interaction contenu-contenant, migration, plastifiants, DEHP, poches pour perfusion, sérums salé et glucosé, FTIR, HPLC, GC-MS.

ABSTRACT

The purpose of this study is to propose an analytical methodology to evaluate content-containing interaction phenomena between pharmaceuticals and plastic packaging; effective processes for extracting plasticisers, in particular diethylhexyl phthalate (DEHP) from polyvinyl chloride (PVC) and reliable analysis methods are applied to determine:

- the DEHP content in DEHP-plasticized PVC material for parenteral use and confirm its absence in declared PVC without phthalates,
- the level of plasticizers, five phthalates, one adipate, two alkylphenols and benzophenone in aqueous solutions for infusion packaged in plastic bags.

In PVC material plasticized with DEHP, the content of this phthalate, determined by UV spectrometry and HPLC is less than 40%, which is in accordance with the limits set by the European Pharmacopoeia. Also, its absence has been confirmed in the new PVC material without phthalates. In addition, its absence has been confirmed in the new PVC material without phthalates.

In aqueous solutions for infusion packaged in new plasticized PVC bags, only DEHP was detected by GC-MS at levels of $4.31 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$ (NaCl 0.9%) and $4.29 \pm 0.25 \mu\text{g/L}$ (glucose 5%) whereas the levels increased 10 times in three-year shelf-life bags.

In the case of multilayer bag (made of polyethylene PE / polyamide PA / polypropylene PP), DEHP was not found but instead, two plasticizers, dibutylphthalate (DBP) and diethyl phthalate (DEP) were detected at levels of 0.7 ± 0.1 and $4.14 \pm 0.6 \mu\text{g} / \text{L}$ respectively. These plasticizers are not mentioned as additives allowed in materials intended for parenteral use. In addition, other compounds as Caprolactam, monomer of the intermediate layer (in PA) and a degradation product of Irgaphos (an antioxidant of PE and PP) were tentatively identified in serums by GC-MS (in X-Calibur database).

The performance of the proposed methodology demonstrated a release of plastic additives; levels remained low but not negligible and might constitute a risk for the patient in the case of reiterative infusions.

Otherwise, the Fourier transform FTIR spectrometry, directly applied on PVC blisters recovered from batches of tablets kept for a period of 3 years showed a small variation in the spectra obtained. This very simple methodology can be adopted during stability studies to provide information on possible content-containing interaction phenomena.

Keywords: content-containing interaction, migration, plasticizers, DEHP, bags for infusion, saline and glucose serums, FTIR, HPLC, GC-MS.

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو اقتراح منهجية تحليلية لتقييم ظواهر التفاعل محتوى-محتوي بين المنتجات الصيدلانية والأغلفة البلاستيكية؛ يتم تطبيق طرق فعالة استخراج الملدنات وخاصة ثنائي إيثيل هكسيل الفثالات (DEHP) من كلوريد البوليفينيل (PVC) وطرق تحليل موثوق بها لتحديد:

- مستوى DEHP في مادة PVC التي تحتوي على DEHP المستخدمة في الحقن والتحقق من عدم وجودها في PVC المعطن بدون فثالات،

- مستوى الملدنات وخمس فثالات وأديبات واحد واثنين من ألكيل الفينول والبنزوفينون في المحاليل المائية المستخدمة في الحقن والمعبأة في أكياس بلاستيكية.

في المنتج المحتوي على البولي فينيل كلوريد الملدن ب DEHP، مستوى الفثالات الذي يحدده قياس طيف الأشعة فوق البنفسجية UV و HPLC، أقل من 40 %، وهو ما يتوافق مع متطلبات دستور الأدوية الأوروبي؛ كما تم تأكيد غيابها في المواد البلاستيكية الجديدة دون الفثالات.

في المحاليل المائية المستخدمة في الحقن المعبأة في أكياس PVC البلاستيكية اللدنة، تم اكتشاف DEHP فقط بواسطة GC-MS عند مستويات 0.5 ± 4.31 ميكروغرام / لتر (كلوريد الصوديوم 0.9 %) و 0.25 ± 4.29 ميكروغرام / لتر (5% جلوكوز) في الأكياس المصنعة حديثاً بينما زادت المستويات 10 أضعاف في الكميات منتهية الصلاحية (مدة الصلاحية لمدة ثلاث سنوات).

في الطبقات المتعددة (المكونة من البولي إيثيلين PE / بولي أميد PA / بولي بروبيلين PP)، لم يتم اكتشاف DEHP ولكن تم اكتشاف اثنين من الملدنات، ثنائي بيوتيل فثالات (DBP) وثنائي إيثيل فثاليت (DEP) عند مستويات 0.1 ± 0.7 و 0.6 ± 4.14 ميكروغرام / لتر، على التوالي. لم يتم ذكر هذه الملدنات كمادة مضافة مسموح بها في المواد المخصصة للاستخدام عن طريق الحقن. بالإضافة إلى ذلك، يتم تحديد المركبات الأخرى مثل Caprolactam (مونومر الطبقة المتوسطة من PA) ومنتج تحلل الإرجافوس (أحد مضادات الأكسدة من البولي أوليفينات PE و PP) في الأمصال بواسطة GC-MS بفضل قاعدة البيانات X-Calibur. أظهر أداء المنهجية المقترحة إطلاق مواد مضافة بلاستيكية بمستويات منخفضة ولكنها مهمة، مما قد يشكل خطراً على المريض في حالة حدوث دفعات متكررة.

من جهة أخرى، أظهر مقياس طيف فورييه FTIR، المطبق مباشرة على عبوات PVC المستردة من مجموعات من الأقرص المخزنة لمدة 3 سنوات، تباين بسيط في الأطياف التي تم الحصول عليها؛ يمكن اعتماد هذه المنهجية البسيطة جداً أثناء دراسات الاستقرار لتوفير معلومات عن ظواهر التفاعل محتوى-محتوي المحتملة

الكلمات المفتاحية: التفاعل محتوى-محتوي، الهجرة، الملدنات، DEHP، أكياس الحقن، مصل ملحي والجلوكوز، GC-MS، HPLC، FTIR.

Allahouma zidni ilma

D'après Anas-ben Malik, le Prophète - paix et salut sur lui - a dit :

« Chaque fois qu'une personne sort de chez elle en quête de savoir, les anges lui déploient leurs ailes, par signes d'agrément pour ce qu'elle fait »

«Aucune richesse n'est plus utile que l'intelligence et la science»

DEDICACES

Je remercie Allah le tout puissant, de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout de ce travail et surtout le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire :

" Ya Karim, Ya Rahim "

Je dédie ce modeste travail à :

La mémoire de mon cher père Mebarek, qui m'a toujours encouragé à poursuivre mes études (qu'Allah ait son âme) ;

Ma mère Sadia, le symbole de tendresse et d'affection, qui s'est sacrifiée et continue à le faire pour me voir heureuse et comblée ;

La mémoire de ma belle-mère Ratiba qui m'a appris beaucoup de choses de la vie surtout la patience (qu'Allah ait son âme) ;

Mon époux, Farid qui s'est montré patient et compréhensif durant ces longues années d'études ;

Mes enfants, Hussein, Islam et Zaineb, qui sont et demeurent ma source de motivation et d'espoir ;

Et à tous ceux qui me sont chers, toute ma famille et mes amis.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce long parcours universitaire, il m'est agréable de remercier vivement tous ceux qui, grâce à leur aide précieuse, ont permis la réalisation de ce travail et particulièrement :

- Le Professeur Moulay Saad, mon directeur de thèse, de m'avoir encadré, soutenu, orienté, supporté durant toutes ces années et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée.
- Le professeur Silvia Lacorte, Directrice du Département, Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC (Barcelone) de m'avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire et dans sa famille ; sans le travail réalisé avec elle, sa motivation et ses encouragements, je n'aurais jamais espéré soutenir un jour...
- Le Professeur H. BOUTOUMI pour l'honneur qu'il me fait en présidant ce jury ainsi que les membres de jury Pr N. Belhaneche Bensemra, Pr S. Kaddour, Pr Mr R. Issaadi et Dr A. Boudis d'avoir accepté d'examiner mon travail.
- Mr Ferkioui, Docteur en Pharmacie et responsable du laboratoire d'analyse de l'IMC Rouiba, pour sa disponibilité, sa confiance et sa générosité pour m'avoir permis d'utiliser gracieusement toutes les matières premières et échantillons dont j'avais besoin pour la réalisation de ce travail.
- Le professeur Y. Badja, qui m'a encouragé à poursuivre mes études doctorales et pour m'avoir conseillé et offert son aide. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

J'exprime également toute ma sympathie à mes amis fidèles de SAIDAL pour leur aide, leur écoute et leur soutien, Touazi FZ., Azoug M., Grib H., Slougui AD., Redjala N. et Benchabakh F., ainsi qu'à mes collègues du département de Génie des procédés et en particulier Mr Boucherit Ahmed, pour leur soutien et encouragement.

J'exprime également toute ma reconnaissance à mes chers étudiants, qui sont restés même après leur départ, disponibles et prêts à m'offrir l'aide bureautique dont j'ai besoin. Ils sont tellement nombreux que je ne pourrais citer leurs noms.

Une attention chaleureuse s'adresse à ma famille et belle-famille ; ma mère, mon mari, mes enfants, mes frères et sœurs, mes nièces et neveux. Leur présence et leurs encouragements pour finaliser ce travail ont été pour moi essentiels durant les périodes de doute où j'avais envie de tout abandonner. Je vous aime infiniment.

Je ne peux oublier d'exprimer toute ma gratitude à mon cercle d'amies ou plutôt mes sœurs Cherif S., Belkessam F., Boutine F. et enfin Boukraa F. (de Djamaate el baraka de l'USTHB) pour leur soutien permanent, leurs conseils et leurs prières en continu.

Enfin, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin ont participé à ce travail.

TABLE DES MATIERES

RESUME	
DEDICACES	
REMERCIEMENTS	
TABLE DE MATIERES	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION	1
1. CONDITIONNEMENT PHARMACEUTIQUE	4
1.1 Les types de conditionnement pharmaceutique	4
1.2 Le rôle du conditionnement pharmaceutique	4
1.3 Les différents matériaux utilisés dans le conditionnement primaire	6
1.4 Les qualités du conditionnement plastique	7
1.5 Les principaux plastiques, applications médicales et pharmaceutiques	8
1.6 Les additifs des matières plastiques	12
1.7 Caractéristiques physico-chimiques du DEHP	15
1.8 Choix des matériaux plastiques dans le conditionnement pharmaceutique	15
2. PHENOMENE D'INTERACTION CONTENU-CONTENANT	18
2.1 Aspects théoriques des mécanismes d'interaction	18
2.2 Facteurs influençant les phénomènes d'interactions contenu-contenant	20
2.3 Aspect réglementaire	22
3. METHODOLOGIE ANALYTIQUE	28
3.1 Méthodes d'extraction	28
3.2 Méthodes d'analyse physico-chimiques	32
4. VALIDATION ANALYTIQUE	43
4.1 Validation d'une méthode analytique	43
4.2 Critères de validation d'une méthode d'analyse	44
5. MISE AU POINT DE METHODES D'ANALYSE DES ADDITIFS DE MATIERES PLASTIQUES A USAGE PHARMACEUTIQUE (CAS DU PLASTIFIANT DEHP DANS LE PVC A USAGE PARENTERAL)	49
5.1 Matériel et méthodes	50

5.1.1	Mise au point et validation de méthodes d'analyse du DEHP dans le PVC plastifié	51
5.1.2	Procédés d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié	53
5.1.3	Application de la méthodologie à l'analyse du DEHP dans des poches pour perfusion et des matières premières (granulé) en PVC plastifié	56
5.1.4	Tentative d'identification du plastifiant alternatif au DEHP par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse GC-MS	57
5.2	Résultats et discussion	58
5.2.1	Validation des méthodes d'analyse du DEHP par spectrométrie UV et par chromatographie HPLC	58
5.2.2	Analyse du DEHP par spectrométrie FTIR	60
5.2.3	Evaluation de l'efficacité des procédés d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié	62
5.2.4	Application de la méthodologie à l'analyse du DEHP dans les poches pour perfusion et les matières premières (granulé) en PVC plastifié	66
	- Analyse des plastifiants par chromatographie sur couche mince (CCM)	68
	- Analyse des plastifiants par spectrométrie FTIR	70
	- Analyse des plastifiants par spectrométrie UV	70
	- Analyse des plastifiants par chromatographie HPLC	71
5.2.5	Tentative d'identification du plastifiant alternatif au DEHP par GC-MS	73
5.3	Conclusion	75
6.	APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE INFRA-ROUGE A TRANSFORMEE DE FOURRIER (FTIR) A L'EVALUATION DES PHENOMENES D'INTERACTION CONTENU-CONTENANT: (COMPRIMES / BLISTER)	77
6.1	Matériels et méthodes	77
6.1.1	Echantillons utilisés	78
6.1.2	Préparation et analyse des échantillons par FTIR	78
6.2	Résultats et discussion	79
6.2.1	Analyse des alvéoles des différents blisters par FTIR	79

6.2.2	Suivi de l'évolution des bandes spécifiques aux additifs et/ou impuretés	81
6.3	Conclusion	86
7.	APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (GC-MS) A L'EVALUATION DES PHENOMENES DE MIGRATION DES PLASTIFIANTS DANS LES POUCHES POUR PERFUSION	88
7.1	Matériel et méthodes	89
7.1.1	Etude de la fiabilité de la méthode d'analyse GC-MS	90
7.1.2	Procédure d'extraction des relargables	91
7.1.3	Vérification de l'efficacité de la méthode d'extraction des relargables	93
7.1.4	Application de la méthode aux essais de migration des relargables à partir de matière première (granulé et film) en PVC	93
7.1.5	Application de la méthode à l'évaluation du taux de relargables dans les solutions aqueuses pour perfusion à partir de poches en plastique	94
7.2	Résultats et discussion	95
7.2.1	Validation de la méthode d'analyse GC-MS	95
7.2.2	Vérification de l'efficacité des méthodes d'extraction des relargables	99
7.2.3	Application de la méthodologie aux essais de migration de plastifiants à partir de matières premières en PVC (granulé et film)	101
7.2.4	Application de la méthodologie à l'évaluation du taux de relargables dans les solutions aqueuses pour perfusion à partir de poches en plastique	106
7.3	Conclusion	115

CONCLUSION GENERALE

APPENDICES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 :	Production européenne en plastiques en 2015 (plasticseurope.org) et formule développée du PVC.	11
Figure 1.2 :	Plastification du PVC.	14
Figure 1.3 :	Consommation des principaux phtalates (greenfacts.org) et formule développée du DEHP.	14
Figure 1.4 :	Production européenne des plastifiants en 1999 et en 2015 du DOP/DEHP (bleu), du DINP/DIDP/DPHP (orange), des autres phtalates (gris) et des autres plastifiants (jaune) dans (European plasticisers).	15
Figure 1.5 :	Les différents niveaux de l'évaluation de la compatibilité d'un conditionnement primaire avec une formulation pharmaceutique.	16
Figure 2.1 :	Les différents phénomènes d'interactions contenu-contenant entre le conditionnement primaire et une formulation pharmaceutique.	19
Figure 2.2 :	Algorithme décisionnel pour la réalisation des études d'interaction C/C.	24
Figure 3.1 :	Dispositifs d'extraction (a) Soxhlet, (b) SPE.	29
Figure 3.2 :	Equilibre de partage d'un soluté A entre deux phases liquides non-miscibles (aqueuse et organique).	30
Figure 3.3 :	Domaine du spectre électromagnétique.	33
Figure 3.4 :	Type de transitions électroniques dans une molécule.	35
Figure 3.5 :	Fréquence fondamentale d'une molécule diatomique.	36
Figure 3.6 :	Grandeurs physiques d'un pic chromatographique.	38
Figure 3.7 :	Schéma d'un système chromatographique.	39
Figure 3.8 :	Chromatographie sur couche mince.	40
Figure 3.9 :	Schéma simplifié d'un GC-MS.	42
Figure 3.10 :	Spec tres de masse du DEHP et du DOP (nist.gov 2017).	42
Figure 4.1 :	Différence entre précision et exactitude.	46
Figure 5.1 :	Schéma du procédé d'extraction du DEHP.	55
Figure 5.2 :	Ligne de sang pour hémodialyse.	57
Figure 5.3 :	Spectre UV et chromatogramme du DEHP.	59
Figure 5.4 :	Linéarité des méthodes UV et HPLC pour l'analyse du DEHP.	59

Figure 5.5 :	Spectre FTIR des films en PVC et PVC plastifié au DEHP à 30%.	61
Figure 5.6 :	Evolution des bandes à 1600 cm ⁻¹ et 1580 cm ⁻¹ en fonction de la concentration du DEHP.	61
Figure 5.7 :	Spécificité des méthodes UV et HPLC pour l'analyse du DEHP.	62
Figure 5.8 :	Suivi de l'évolution des bandes à 1600 cm ⁻¹ et 1580 cm ⁻¹ du DEHP en fonction du procédé d'extraction.	65
Figure 5.9 :	Analyse par CCM du PVC plastifié (au DEHP et alternatif).	68
Figure 5.10 :	Analyse par FTIR du PVC plastifié (au DEHP et alternatif).	70
Figure 5.11 :	Analyse par spectrométrie du PVC plastifié (au DEHP et alternatif)	70
Figure 5.12 :	Chromatogrammes HPLC des extraits obtenus avec le PVC plastifié (au DEHP et alternatif).	71
Figure 5.13 :	Chromatogrammes GC-MS des extraits du PVC plastifié (sans phtalates) et d'une solution de référence de DEHP.	73
Figure 6.1 :	Préparation des alvéoles pour analyse par FTIR	78
Figure 6.2 :	Spectre du film en PVC avant conditionnement (à T0).	79
Figure 6.3 :	Variation de la surface des bandes secondaires dans le cas du PVC.	81
Figure 6.4 :	Variation de la surface des bandes secondaires dans le cas du PVC/PVDC	81
Figure 6.5 :	Evolution de la bande à 1730 cm ⁻¹ (dans le cas du PVC).	82
Figure 6.6 :	Evolution des bandes à 1090 et 1190 cm ⁻¹ dans les cas du PVC et PVC/PVDC.	83
Figure 6.7 :	Evolution de la bande à 1017 cm ⁻¹ dans le cas du PVC.	83
Figure 7.1:	Chromatoramme d'une solution standard de plastifiants à 0,3µg/L.	96
Figure 7.2 :	Taux de migration de différents contaminants à partir de matières premières en PVC (granulé et film) après stérilisation à 121°C pendant 20 min par SPE (n = 3).	104
Figure 7.3 :	Chromatogrammes et spectre de masse du DEHP (M/z = 149) dans le granulé et le film (stérilisation à l'autoclave, extraction SPE	105
Figure 7.4 :	Taux en (µg/L) de plastifiants retrouvés dans les solutions pour perfusion conditionnées dans les poches en PVCP, PVCN et en MCP.	106
Figure 7.5 :	Chromatogrammes des plastifiants retrouvés dans les solutions de NaCl conditionnées dans les poches en PVCN, en PVCP et en MCP avec une solution standard à 10 µg/L après extraction par SPE.	106

Figure 7.6 :	Scan de la solution de perfusion conditionnée dans le PVCP.	111
Figure 7.7 :	Scan de la solution pour perfusion conditionnée dans la MCP (mode TIC à $m/z=149$ pour les phtalates).	112
Figure 7.8 :	Scan de la solution pour perfusion conditionnée dans la MCP (pics non identifiés).	113

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 :	Matières plastiques utilisées dans les domaines pharmaceutique et médical.	9
Tableau 2.1 :	Risque propre à un contenant.	24
Tableau 5.1 :	Matières premières, échantillons et réactifs utilisés.	50
Tableau 5.2 :	Conditions chromatographiques pour l'analyse des plastifiants par GC-MS.	58
Tableau 5.3 :	Précision des méthodes UV et HPLC pour l'analyse du DEHP.	60
Tableau 5.4 :	Rendements d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié à 30% par les différents procédés proposés.	63
Tableau 5.5 :	Résultats de la fiabilité du procédé d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié par la méthode indirecte.	65
Tableau 5.6 :	Résultats de l'analyse du DEHP dans les poches pour perfusion et les MP (granulé) en PVC plastifié.	67
Tableau 5.7 :	Résultats de l'analyse par GC-MS.	74
Tableau 6.1 :	Résultats des vibrations observées dans le cas du PVC.	79
Tableau 6.2 :	Evolution des surfaces des bandes secondaires dans le cas du PVC et PVC/PVDC (écarts types pour n = 6).	82
Tableau 7.1 :	Matériel, substances de référence et réactifs utilisés.	88
Tableau 7.2 :	Résultats de la fiabilité de la méthode GC-MS pour l'analyse des additifs de matières plastiques.	97
Tableau 7.3 :	Rendements d'extraction par LLE et SPE des relargables dans les solutions de NaCl et de glucose chargées à 1 µg/L (BC) et 10 µg/L (HC), n=3.	101
Tableau 7.4 :	Composés identifiés dans les solutions pour perfusion conditionnées dans des poches en PVC et en MCP (librairie X-Calibur).	108

INTRODUCTION

Le conditionnement pharmaceutique doit contenir, préserver, protéger et délivrer le produit médicamenteux, de sorte qu'à n'importe quel moment avant sa date d'expiration, il réponde aux exigences de qualité, sécurité et efficacité [1].

Les matières plastiques présentent des propriétés très intéressantes (souple, flexible, légère, incassable, malléable) qui leur permettent d'envahir le domaine du conditionnement (plus de 38%) dans le domaine alimentaire et pharmaceutique surtout avec les nouveaux matériaux innovants à usage unique [2]. Elles sont constituées en général d'une résine à laquelle sont rajoutés des additifs comme des antioxydants, des stabilisants, des charges, des colorants leur apportant les caractéristiques nécessaires à leurs utilisations.

Différents phénomènes peuvent se produire entre le contenu et le contenant et altérer la qualité du produit comme la sorption, la perméation et le relargage, ce dernier suscitant un plus grand intérêt du fait des conséquences qui en découlent [1]. En effet, les additifs ne sont pas liés chimiquement à la résine polymérique et peuvent migrer dans la forme pharmaceutique et constituer un risque sur la qualité et surtout la toxicité du produit fini [3,4].

La contribution des contaminants provenant de matières plastiques dans le contenu liée au phénomène de migration est estimée 100 fois plus importante que celle des polluants atmosphériques et des pesticides [5]. Il est donc nécessaire d'analyser avec soin les interactions contenant-contenu afin d'identifier les risques associés à la perte de substance active (sorption) et surtout au relargage d'additifs du conditionnement plastique lors des étapes de développement du médicament pour la maîtrise de la qualité du produit et la sécurité du patient.

Devant l'ampleur et la diversité des phénomènes qui peuvent se produire entre le couple (contenant/contenu) liées à la morphologie du polymère, son procédé de fabrication, les produits de synthèse, les additifs ..., d'une part, et la forme pharmaceutique, sa composition, ses caractéristiques...d'autre part, il est impossible d'envisager une méthode harmonisée et unique pour les évaluer. Pour ce, une stratégie ou approche méthodologique est proposée dans le domaine agro-alimentaire et pharmaceutique basée sur des scénarios simulant les conditions les plus défavorables et agressives d'utilisation [6,7].

Par ailleurs, les substances chimiques, utilisées comme additifs de matières plastiques doivent être autorisées par le règlement REACH sur la base d'études toxicologiques [8].

Différents types de plastiques sont utilisés dans le conditionnement de produits pharmaceutiques dont le polychlorure de vinyle (PVC) qui présente de bonnes propriétés mécaniques, électriques, chimiques et thermiques et représente environ 11% du marché des plastiques, dont 15% sont destinés au conditionnement [9]. Il est utilisé sous sa forme rigide (cas des blisters) mais encore plus sous sa forme souple (cas des dispositifs médicaux comme les tubulures, sondes, poches, cathéters...). En effet, l'ajout de plastifiant à la résine en PVC lui confère des caractéristiques très intéressantes de flexibilité, de malléabilité et de durabilité [10].

Parmi les plastifiants, le phtalate de di-(2-éthylhexyle) (DEHP) est le plus apprécié pour les propriétés mécaniques uniques qu'il confère au PVC mais aussi pour son rapport qualité/prix [11,12]. Cependant, des études toxicologiques ont démontré que ce phtalate est un perturbateur du système endocrinien pouvant altérer la fertilité et, par conséquent, il a été classé par les instances réglementaires comme une substance hautement préoccupante, toxique pour la reproduction catégorie IB [13]. Aussi, sa capacité de migration à partir de dispositifs médicaux dans les milieux à caractère lipophile a été prouvée par de nombreuses études [14-21]. Pour ce, il a été interdit dans les matières plastiques utilisées dans les jouets et articles de puériculture pouvant être placés dans la bouche des enfants [22] et dans les dispositifs médicaux destinés à la pédiatrie, néonatal et maternité [23]. Sa substitution par d'autres plastifiants moins toxiques est recommandée [24].

Paradoxalement, ce phtalate reste toujours autorisé par la pharmacopée européenne dans le PVC plastifié utilisé dans les récipients et tubulures à usage parentéral à raison de 40% (m/m) [25].

L'objectif de cette étude est de développer une méthodologie analytique pour évaluer les phénomènes d'interaction contenu-contenant entre le conditionnement plastique et la forme pharmaceutique. Devant le problème du DEHP, ses effets toxicologiques prouvés mais surtout au fait qu'il soit encore autorisé dans l'industrie pharmaceutique pour un usage parentéral, l'étude de compatibilité s'est focalisée sur le matériau à base de PVC rigide et plastifié pour les usages oral et parentéral mis en contact avec une forme solide (comprimé) et une solution aqueuse pour perfusion (sérum salé 0,9% et glucosé 5%).

Cette orientation est justifiée au fait que la poche de sérum subit, au cours de son procédé de fabrication, une stérilisation à l'autoclave (121°C pendant 20min), ce facteur étant favorable au relargage du DEHP [19, 26, 27] d'une part, et à la voie d'administration intraveineuse qui permet sa biodisponibilité totale dans le sang, d'autre part.

Les objectifs spécifiques visés dans cette étude sont :

- Mise au point d'une méthodologie d'extraction et d'analyse (par spectrométrie UV et par chromatographie liquide HPLC) du DEHP dans le matériau en PVC plastifié à usage parentéral.
- Utilisation de la spectrométrie FTIR pour évaluer les phénomènes d'interaction contenu-contenant (cas des blisters PVC en contact d'une forme pharmaceutique solide (comprimé)).
- Développer une méthodologie d'extraction (liquide liquide LLE et en phase solide SPE) et d'analyse (par GC-MS) d'une série d'additifs dont les plastifiants et son application à :
 - L'évaluation de leur potentiel de migration à partir de matières premières (sous forme de granulé et film) utilisées dans la fabrication de matériel médical.
 - La détermination de leurs teneurs dans les solutions intraveineuses aqueuses utilisées comme véhicules de produits pharmaceutiques (NaCl à 0.9% et glucose à 5%) conditionnées dans des poches en PVC plastifié et en multicouches.

Les résultats seront comparés aux normes fixées par la réglementation en vigueur.

1 CONDITIONNEMENT PHARMACEUTIQUE

Le conditionnement pharmaceutique fait partie intégrante du médicament et assure que ce dernier réponde aux exigences lui permettant sa mise sur le marché en toute sécurité.

1.1 Les types de conditionnement pharmaceutique [28-30].

Le conditionnement primaire.

C'est « le récipient ou tout autre forme de conditionnement avec lequel le médicament se trouve en contact direct » avec le produit ex. blister, flacon, ampoule.... Cette phase de conditionnement primaire, où le produit semi ouvert est placé dans son enveloppe de protection, est délicate puisqu'il est encore en contact avec le milieu extérieur.

Le conditionnement secondaire.

Il est représenté en général par l'étui. Ce type de conditionnement n'est pas en contact direct avec le médicament mais il le protège. Il peut comporter plusieurs conditionnements primaires (blisters, ampoules...) ainsi qu'une notice. Le papier et le carton sont très utilisés pour cet emballage extérieur. Ces matériaux sont légers et peu chers.

Le conditionnement tertiaire.

C'est la dernière étape d'emballage avant l'envoi aux clients (grossistes/répartiteurs, officines). Il comprend une mise en fardeau éventuelle des conditionnements secondaires, un regroupement en caisse puis en palettes pour le transport.

1.2 Le rôle du conditionnement pharmaceutique.

Rôle de protection du médicament.

Ce rôle de protection permet l'assurance de l'efficacité et de la sécurité d'un médicament et garantit la qualité du produit pour le patient. Le conditionnement doit protéger le médicament des éventuelles contaminations microbiennes (étanchéité) mais aussi d'éléments physiques comme la température et la lumière si le produit est thermosensible et / ou photosensible ou encore l'humidité pour des produits effervescents par exemple.

Le conditionnement doit également protéger le médicament lors de son transport, c'est à-dire assurer une solidité essentielle contre les chocs.

Bien entendu, les matériaux utilisés lors du conditionnement doivent être inertes vis à vis du principe actif et de ses excipients.

Rôle fonctionnel.

La prise de médicaments doit être facilitée par sa présentation. C'est-à-dire que le mode d'administration doit être aisé, pratique. De plus, il doit être précis quant à la dose à administrer (distributeurs de doses de broncho-dilatateurs, seringues à insuline réglables, pilules contraceptives avec l'inscription de dates sur le blister, blisters prédécoupés pour d'éventuelles séparations des unités...).

Une forme galénique adaptée permet une meilleure observance du traitement. Il existe un réel effort de la part des industriels de santé dans la recherche du conditionnement optimal destiné à des patients ciblés. Par exemple, il est plus aisé et plus précis de distribuer les antibiotiques en solution aux enfants en bas âge grâce à une seringue plutôt qu'une cuillère à café. Cette seringue fait partie intégrante du conditionnement secondaire.

Elément de sécurité.

Le conditionnement ne doit pas porter atteinte à la santé de l'utilisateur. C'est pourquoi, il est retrouvé, par exemple sur les boîtes de médicaments à base de substances suivant la réglementation des stupéfiants, des sceaux sécuritaires garantissant l'inviolabilité du produit fini. Pour les sirops pédiatriques, des bouchons « Child proof » empêchent l'enfant d'ouvrir seul son médicament.

Rôle d'identification et d'information.

L'emballage est un moyen d'identifier le produit et de le différencier rapidement des autres. En effet, les comprimés sont souvent similaires d'une spécialité à une autre et un comprimé sorti de son emballage est difficilement identifiable. Par contre, sur la boîte et sur le blister, le nom du produit avec son dosage est retrouvé.

L'emballage est également un moyen d'information par l'intermédiaire de la notice et des informations figurant sur la boîte. Les renseignements portés sur ces types de conditionnement sont régis pour certains d'entre eux par les autorités de santé. En effet, l'indication, la posologie, les contre-indications, les effets indésirables sont des informations obligatoires à donner au patient.

Rôle marketing.

Le choix du design, des logos et des couleurs relève d'une décision marketing pour satisfaire le patient. Ce rôle est plus important pour les médicaments non remboursés qui peuvent être achetés par le patient sans ordonnance.

Cet aspect du conditionnement n'est pas le plus important, notamment pour le patient mais c'est un choix stratégique important pour l'industriel.

1.3 Les différents matériaux utilisés dans le conditionnement primaire [28-30].

Le conditionnement primaire doit assurer le maintien de la qualité initiale du produit, depuis sa fabrication jusqu'à sa consommation; les principaux critères de choix des matériaux utilisés dans le conditionnement primaire, sont l'inertie, la faible perméabilité et une neutralité satisfaisante (goût). En effet, le matériau ne doit pas interagir avec son contenu et doit le protéger au mieux du milieu extérieur (chaleur, humidité, lumière, gaz, contaminations...).

Des essais sont effectués pendant la mise au point du médicament (études de stabilité) afin d'identifier les matériaux les plus appropriés, compte tenu des implications financières.

Les emballages en verre.

Les principales matières premières du verre sont le sable, les calcaires et la soude. La silice (SiO_2) est le principal composant du sable, et les calcaires et la soude sont d'habitude à la forme de carbonates tels que le Na_2CO_2 et le CaCO_2 . D'autres matériaux sont trouvés dans la composition du verre, tel que le plomb, qui donne la clarté et l'éclat au produit, mais qui a comme conséquence la production d'un verre de basse qualité, et l'alumine (Al_2O_3), qui est fréquemment utilisée pour augmenter la durabilité et la dureté. Le verre pour conditionnement est fabriqué dans des usines automatisées. Il se retrouve dans diverses industries comme l'agroalimentaire, la parfumerie, la pharmacie et parapharmacie, le cosmétique. Il est utilisé dans la fabrication de bouteilles, de flacons, de pots, de bonbonnes, d'ampoules et de piluliers.

L'emballage métallique.

Les matériaux communément utilisés sont l'acier et l'aluminium. L'emballage métallique se retrouve plus dans le domaine agroalimentaire ex. des boîtes de conserve et les boîtes pour boisson mais l'aluminium est aussi utilisé dans l'industrie pharmaceutique (blisters, d'aérosols et de vaporisateurs...) car il offre un niveau optimal de conservation et de protection contre les ultraviolets, l'humidité et l'oxydation.

Les matières plastiques [1, 28].

Le plastique, grâce à ses qualités de brillance, légèreté, malléabilité et son faible coût de revient, bénéficie d'un large développement pour tout type d'usage et de forme. Une grande variété de matières plastiques est utilisée dans le conditionnement des produits pharmaceutiques.

Les matières plastiques sont utilisées dans la fabrication de pilulier ou blister (comprimé), tube (pommade), poches et flacons (solution pour perfusion) et dans tout le matériel médical et chirurgical de pointe (seringues, sondes, tubulures...)

Deux grandes classes de matières plastiques sont utilisées : Les thermoplastiques et les thermodurcissables.

➤ Les thermoplastiques, comme le PVC, le PE (polyéthylène), le PP (polypropylène), se ramollissent sous l'action de la chaleur et se fixent par refroidissement sans faire intervenir de réaction chimique.

➤ Une matière thermodurcissable, au contraire, se durcit de façon irréversible après une première application de chaleur. En outre, il se produit une réaction chimique de polymérisation.

Presque tous les matériaux plastiques employés dans l'emballage sont des thermoplastiques. Ils peuvent aussi être utilisés en complexes pour améliorer certaines caractéristiques physico-chimiques ou et/ou mécaniques.

1.4 Les qualités du conditionnement plastique [28, 30].

Les qualités les plus appréciées des matières plastiques peuvent être classées en trois catégories:

- Leurs propriétés physiques, mécaniques, chimiques, biologiques, qui sont des qualités intrinsèques. On peut notamment citer leur faible densité, leur transparence ou translucidité.

Par ailleurs, selon les polymères (nature chimique, masse et structure des chaînes), il est possible d'avoir des matériaux de rigidité variée (souple ou rigide) qui peuvent résister aux chocs, aux agents chimiques, aux rayonnements ionisants et présentant une bonne compatibilité avec différents milieu;

- Leur aptitude à être mises en œuvre, notamment leur facilité de transformation et d'assemblage ;

- Leur aptitude à pouvoir être identifiées et contrôlées, ce qui permet d'établir une standardisation et une réglementation.

En effet, dans ce cadre, les pharmacopées internationales et européenne rédigent et publient des monographies sur les matières plastiques destinées aux usages pharmaceutiques et médicaux, comportant des essais spécifiques d'identification et généraux de contrôle. Ainsi de nombreux matériaux sont concernés par ces normes. Cependant, en raison de leur grande variété et de l'élaboration continue de nouveaux matériaux innovants pour de nouvelles applications, toutes les matières plastiques ne sont pas inscrites dans les Pharmacopées.

1.5 Principaux plastiques, applications médicales et pharmaceutiques [1].

Les matières plastiques utilisées dans les domaines pharmaceutique et médical sont nombreuses cependant, grâce au développement technologique dans le domaine pharmaceutique et celui des polymères, de nouveaux matériaux plastiques se montrent intéressants pour certaines applications médicales spécifiques. Le Tableau 1.1 regroupe celles qui sont les plus souvent employées dans ce domaine.

Le Polychlorure de vinyle (PVC) [31, 32].

Le PVC est obtenu par polymérisation du chlorure de vinyle monomère (CVM). La synthèse est réalisée par voie radicalaire au moyen d'initiateurs appropriés. La découverte de cette réaction de polymérisation par le chimiste français Regnault date de 1835 et la synthèse du monomère (CVM) depuis 1970 dont la formule semi-développée est $\text{CH}_2=\text{CHCl}$.

Le monomère (CVM) est obtenu en 2 étapes:

- Production de 1,2 dichloroéthane, soit par chloration de l'éthylène au moyen du chlore et/ou d'acide chlorhydrique, soit par oxychloration de l'éthylène par le chlorure d'hydrogène en présence d'air (ou d'oxygène),
- Pyrolyse du 1,2 dichloroéthane en chlorure de vinyle.

Il existe plusieurs procédés industriels de polymérisation du chlorure de vinyle monomère :

- en suspension,
- en masse,
- en émulsion,
- en micro-suspension.

Le poids moléculaire du PVC est compris entre 50 000 et 1 00 000 et il est chimiquement inerte (formule développée représentée dans la Figure 1.1).

Tableau 1.1 : Matières plastiques utilisées dans les domaines pharmaceutique et médical [1].

Matière plastique	Application pharmaceutique et médicale	Dispositifs médicaux
PVC (polychlorure de vinyle) plastifié	Récipients pour le sang, les produits du sang et les solutions aqueuses pour perfusion intraveineuse, blisters	Tube pour les perfuseurs, tubulures de circulation extracorporelle, sondes trachéales, digestives ou respiratoires
PE (polyéthylène) et PP (polypropylène)	Sachets de conditionnement stériles, récipients de solutions aqueuses pour perfusion	Cathéters, pistons et corps de seringues, protecteurs d'aiguilles et d'embouts, sutures chirurgicales
PA (polyamide)	Films pour emballage	Cathéters intracardiaques, sondes urétrales, sutures chirurgicales, filtres à sang, embase et embouts de perfuseurs.
PS (polystyrène)		Chambres compte-gouttes, chambres de débullage
PMMA (poly-méthacrylate de méthyle)		Lentilles de contact, prothèses dentaires
PET (poly téréphtalate d'éthylène)	Films d'emballage, flacons	Fils de sutures chirurgicales, prothèses vasculaires tricotées
PU (polyuréthane)		Cathéters, sondes vésicales et urétrales, pansements autocollants transparents

Les résines de PVC obtenues ne sont jamais utilisées telles quelles; pour leur mise en œuvre, elles ont besoin d'ajout d'adjuvants qui vont, d'une part, éviter la décomposition du polymère par déhydrochloruration et, d'autre part, assurer un bon écoulement dans les appareils de transformation à côté d'autres additifs qui sont incorporés pour obtenir des propriétés particulières de l'objet fini telles que souplesse, coloration... .

L'homogénéisation de ces ingrédients avec le PVC est réalisée au cours d'un traitement thermomécanique qui permet de fabriquer des mélanges prêts à l'emploi se présentant sous forme de poudres sèches, de granulés ou de pâtes plus ou moins visqueuses.

Ces mélanges prêts à l'emploi sont ensuite transformés sur des machines appropriées qui, par apport d'énergies thermique et mécanique, permettent d'obtenir soit des objets finis, soit des matériaux semi-finis.

Défauts de polymérisation.

Lors de la polymérisation, des défauts de structure apparaissent généralement. Ils engendrent l'apparition de chlores labiles, en position allylique par exemple, point de départ du phénomène de déshydrochloruration. De façon générale, sous une source d'énergie (thermique ou lumineuse) ou suite à une contrainte mécanique, la perte du chlore labile entraîne, en plus du dégagement de chlorure d'hydrogène (HCl), l'apparition d'une double liaison.

Même si la consommation diminue depuis quelques années, passant de 13% de la production européenne en matériaux plastiques en 2007 à 10% en 2015, le PVC reste le troisième polymère de commodité le plus utilisé au monde après le polyéthylène PE et le polypropylène PP (Figure 1.1) [9]. Cette place s'explique par le fait que le matériau est incolore, transparent, souple et résistant aux chocs, à l'abrasion et à la corrosion. De plus, sa souplesse peut être adaptée à volonté par ajout de plastifiants. Selon la présence de plastifiants ou pas, on obtient un mélange plastifié PVC-P (dit souple) ou non plastifié PVC-U (dit rigide) (selon la désignation ISO 1043-1) [33].

➤ Le PVC à usage médical [28-30].

Le polymère vierge possède les caractéristiques physico-chimiques essentielles qui lui confèrent la plupart de ses qualités techniques (performances mécaniques, transparence, compatibilité chimique notamment). Mais ce polymère vierge a cependant l'inconvénient d'être rigide et relativement sensible à la dégradation thermique ou photochimique. C'est pourquoi certains additifs sont utilisés pour améliorer ses propriétés et dont les principaux sont les antioxydants, les plastifiants, les stabilisants (qui absorbent l'acide chlorhydrique libéré lors de la décomposition thermique du PVC) et les lubrifiants.

En effet, l'ajout de plastifiants en particulier lui confère des propriétés de flexibilité et de souplesse qui le propulse comme matériau de choix dans les applications médicales.

Son utilisation dans la fabrication de poches pour perfusion semble offrir une plus grande sécurité par rapport aux flacons en verre en ce qui concerne la contamination bactérienne (système clos par absence de prise d'air, suremballage, ajout de médicament facilité par la présence d'un site d'injection spécifique et différent du site d'administration). Aussi, ses critères purement technologiques favorisent son utilisation par rapport aux autres polymères.

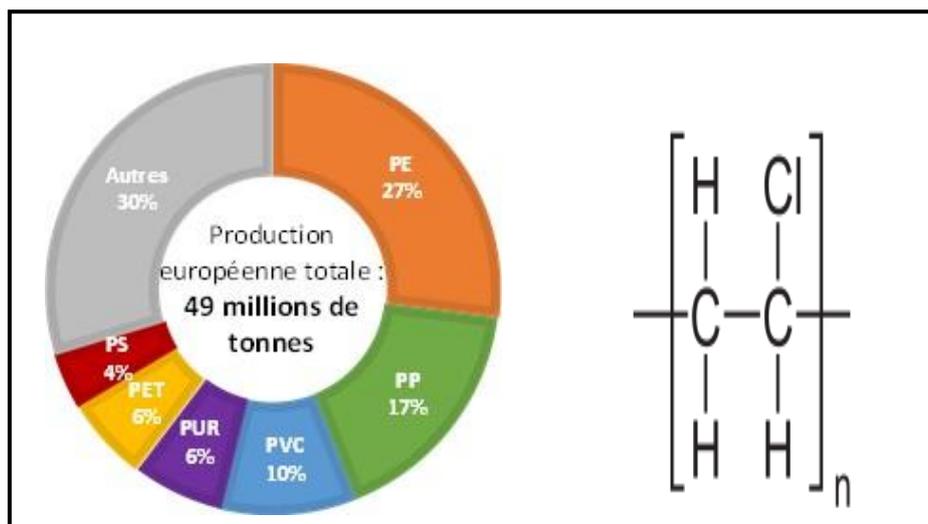


Figure 1.1 : Production européenne en plastiques en 2015 (plasticseurope.org) et formule développée du PVC.

Par ailleurs, à la différence de beaucoup de polymères, le PVC n'est pas issu à 100% ou presque de ces ressources fossiles limitées dont provient l'éthylène par exemple, puisqu'il est constitué pour 57% de chlore, obtenu par électrolyse du sel (le chlorure de sodium) dont les réserves sont virtuellement inépuisables [32].

Le PVC occupe donc une place particulière dans le développement de l'arsenal polymérique mis à la disposition de la technologie médicale et pharmaceutique (Nécessaires de transfusion et de perfusion, appareils médicaux...).

En même temps, c'est probablement le polymère qui a suscité le plus de questions du point de vue de la toxicologie et de l'environnement en rapport avec la toxicité du monomère de chlorure de vinyle et des produits de dégradation chlorés.

Les exigences réglementaires dans le cas des résines à usage alimentaire ou médical ont fixé la teneur limite en monomère de chlorure de vinyle à 1 mg/kg de résine (ou 1 ppm) à cause de son caractère cancérigène [34].

1.6 Les additifs des matières plastiques [10, 35, 37].

Des additifs sont incorporés à la résine polymérique pour la protéger et pour préserver sa stabilité (comme les stabilisants thermiques, antioxydants, anti-UV...) ou pour améliorer ses performances mécaniques (dureté, résistance à la fissuration), sa mise en œuvre, ses caractéristiques (densité, effets optiques) ou juste pour diminuer son coût.

Les stabilisants.

Le rôle des stabilisants est de fixer les chlorures d'hydrogène libérés lors de la déshydrochloruration, réaction auto-catalytique due à la chaleur, à la lumière ou à l'oxygène. Ainsi, les stabilisants permettent d'éviter les réactions secondaires lors la mise en œuvre du PVC, mais aussi d'augmenter sa stabilité thermique. Les stabilisants à base de plomb sont largement utilisés, mais ils sont progressivement éliminés de la formulation des PVC pour des raisons de toxicité. Ils sont essentiellement remplacés par des stabilisants à base d'étain ou de mélanges calcium/zinc ou calcium/stabilisants organiques. Leurs concentrations varient de 0.05% à 2%, allant parfois jusqu'à 5% pour certaines applications.

Les lubrifiants.

Il existe deux types de lubrifiants : externes et internes. Les lubrifiants externes limitent l'adhérence et réduisent les frottements du PVC contre les parois métalliques de l'outil de mise en œuvre. Ils facilitent ainsi l'écoulement du PVC sur le métal chaud et évitent sa décomposition. Des paraffines et des cires de polyéthylène, incompatibles avec le PVC, sont ainsi introduites pour faciliter le glissement. De plus, afin de limiter les interactions intermoléculaires au sein du PVC lors de sa transformation qui peuvent engendrer une dégradation thermique, des dérivés d'alcool et d'ester d'acides gras, souvent l'acide stéarique, sont utilisés comme lubrifiants internes.

Les modificateurs de résistance aux chocs.

Les modificateurs de résistance aux chocs, également appelés agents antichocs, sont généralement des polymères de la famille des polyéthylènes chlorés, des polyacrylates et des copolymères méthyl méthacrylate-butadiène-styrène (MBS) ou acrylonitrile-butadiène-styrène (ABS). Leur rôle est de diminuer la fragilité du PVC, en particulier à basse température.

Les charges.

Elles sont utilisées à la fois comme diluants bon marché (diminuer le coût de production) et comme charges fonctionnelles (augmenter l'opacité du matériau, renforcer ses propriétés mécaniques (résistance à la traction, à la flexion, à la compression, etc.)). Ce sont des substances inertes, généralement minérales, comme du carbonate de calcium, du talc ou des oxydes métalliques.

Les pigments.

Des pigments sont rajoutés pour colorer le polymère; ils peuvent être organiques (les pigments azoïques, diazoïques, phthalocyanines...) ou inorganiques (comme les minéraux naturels à base d'oxydes de fer, ..).

D'autres additifs comme les agents antistatiques, les agents de nucléation, les retardateurs de flammes peuvent se retrouver dans la résine polymérique en fonction de leur utilité en plus des impuretés comme des résidus de la catalyse ou des monomères n'ayant pas réagi.

Les plastifiants.

Le rôle des plastifiants est principalement d'améliorer la souplesse et la résistance au choc et au froid du PVC en diminuant les interactions entre les chaînes de polymère et en abaissant la température de transition vitreuse (T_g). Cette dernière, d'une valeur comprise entre 75 et 85°C pour un PVC rigide, peut atteindre - 40°C pour un PVC souple. L'ajout de plastifiant, qui peut représenter jusqu'à 50% de la masse finale du matériau et confère au matériau souplesse, extensibilité et l'élasticité désirée.

En général, la plastification peut être interne, par modification chimique du polymère ou par copolymérisation, ou externe par ajout d'un plastifiant. Cependant, l'abaissement de la T_g est plus important dans le deuxième cas. Ce type de plastification est donc souvent privilégié par les industriels.

Ainsi, lors de la plastification externe, le plastifiant s'insère entre les chaînes de polymères et joue un rôle de « solvant » (Figure 1.2). Le plastifiant et le polymère sont alors liés par des interactions électrostatiques de type Van der Waals. Ces interactions s'effectuent entre les atomes de chlore du PVC et les groupements électrophiles des plastifiants, et leur intensité dépend notamment de la polarité du plastifiant.

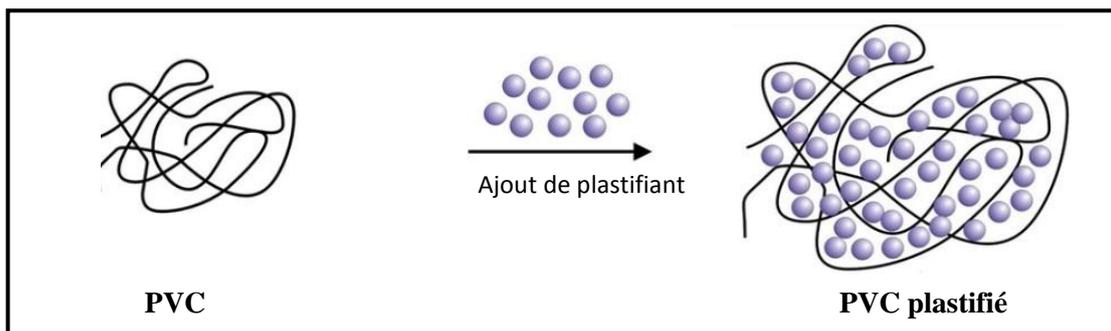


Figure 1.2 : Plastification du PVC

Parmi les familles de plastifiants les plus utilisées, les phtalates sont les plus courants en raison de leurs performances en termes de plastification et de compatibilité avec le PVC, et de leur coût peu élevé. Ils sont parfois combinés à d'autres plastifiants comme les esters d'acides aliphatiques di-carboxyliques dans le but d'améliorer les propriétés aux basses températures.

Les esters phtaliques sont synthétisés à partir de l'anhydride phtalique et de l'alcool approprié. Ils sont omniprésents dans notre environnement. Ils entrent dans la composition des revêtements de sols, des peintures, des câbles, ... mais aussi des jouets, des emballages alimentaires, des produits cosmétiques, des emballages gastro-résistants des médicaments et bien sûr des dispositifs médicaux (DM) [37].

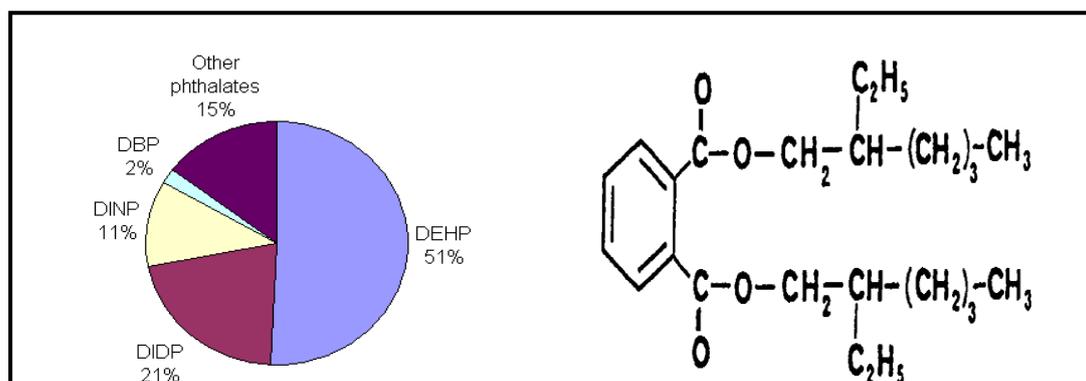


Figure 1.3 : Consommation des principaux phtalates (greenfacts.org) et formule développée du DEHP.

Le phtalate le plus utilisé dans le domaine pharmaceutique est le phtalate de 2-di-(éthylhexyle) (DEHP) comme c'est indiqué dans la Figure 1.3 mais son classement comme perturbateur endocrinien l'a déclassé au profit d'autres plastifiants plus sûrs (Figure 1.4).

Mais, il se retrouve encore dans le PVC utilisé pour la fabrication de DM comme les nécessaires de perfusion, de transfusion, les prolongateurs, les dispositifs de nutrition entérale et parentérale (sondes, tubulures, poches), ou encore les abords respiratoires (trachéotomie), les dispositifs de circulation extracorporelle et de drainage divers (drains, poches de recueil, sondes rectales, urinaires, urétérales) etc.

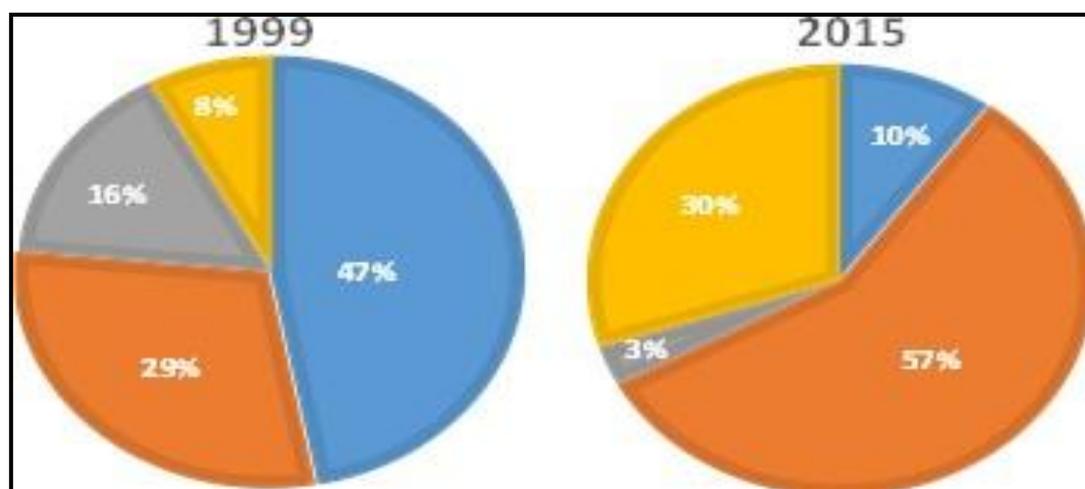


Figure 1.4 : Production européenne des plastifiants en 1999 et en 2015 (DOP/DEHP (bleu), DINP/DIDP/DPHP (orange), autres phtalates (gris) et autres plastifiants (jaune)) dans (European plasticisers).

1.7 Caractéristiques physico-chimiques du DEHP [10, 37].

Le DEHP est synonyme de di-2-éthylhexylphtalate. Il a aussi été référencé sous le nom de phtalate de di (2-éthylhexyle), bis (2-éthylhexyl) phtalate, l'acide 1,2-benzènedicarboxylique, bis (2-éthylhexyl) ester, ou encore éthylhexyl phtalate. Son poids moléculaire est de 390,62 et sa formule développée est représentée dans la Figure 1.3. Il s'agit d'un liquide peu coloré, d'aspect huileux et sans odeur. Il est très peu soluble dans l'eau (0,01 g/ 100 ml à 25°C) mais très soluble dans les solvants organiques (alcools) et les huiles. Son coefficient de partage (octanol/eau) est de 4,89.

1.8 Choix des matériaux plastiques dans le conditionnement pharmaceutique [38, 39].

L'inertie (notamment chimique) est la caractéristique la plus importante des matières plastiques utilisées dans le domaine pharmaceutique et médical.

Les interactions entre ces matériaux et les produits pharmaceutiques comprennent entre autres, la sorption, qui est l'adsorption ou l'absorption de constituants de la formulation pharmaceutique par les matériaux, et la migration des molécules contenues dans ce dernier vers les préparations pharmaceutiques.

Ces interactions mutuelles matériaux plastiques / médicaments peuvent affecter aussi bien l'intégrité et la qualité des matériaux que la stabilité, l'efficacité et la sécurité des médicaments. La preuve de cette compatibilité est exigée par les autorités réglementaires et l'étude analytique de ces interactions représente la base de l'évaluation qui peut être résumée par la Figure 1.5.

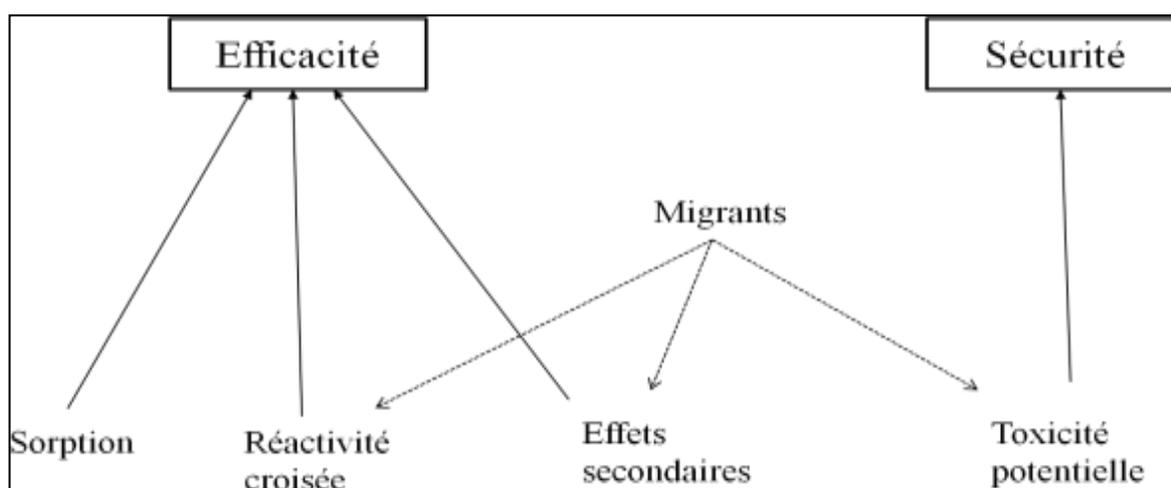


Figure 1.5 : Les différents niveaux de l'évaluation de la compatibilité d'un conditionnement primaire avec une formulation pharmaceutique.

Phénomène de sorption: s'il s'agit principalement du principe actif, ce phénomène peut engendrer une diminution de l'efficacité du médicament et la réponse aux indications prévues pour l'usage ne sera pas atteinte.

Phénomène de migration: ce phénomène est plus complexe car il peut engendrer des conséquences sur l'efficacité et/ou la sécurité du médicament. En effet,

L'efficacité peut être influencée de deux façons :

- la réactivité d'un composé contenu initialement dans le polymère avec un constituant de la formulation pharmaceutique et conduit à une modification de la molécule active et de ce fait à son inactivation.
- Les effets secondaires qui reflètent le cas où les migrants modifient l'une des propriétés du médicament (par exemple le pH) qui influence elle-même d'une manière directe ou indirecte l'efficacité ; par exemple, un migrant acide ou basique peut imposer au principe actif un pH différent de son pH de spécification.

La sécurité: La migration des constituants des matériaux plastiques vers le contenu peut entraîner un risque de toxicité potentielle lié à ces migrants. Ces derniers peuvent avoir plusieurs origines ; ils peuvent résulter de la synthèse et de la mise en forme du matériau, de sa formulation ainsi que des traitements stérilisants auxquels il est soumis. On peut ainsi retrouver des réactifs utilisés lors de la synthèse (monomères résiduels, catalyseurs, ...), des résidus de polymérisation (oligomères) et des additifs (qui sont rajoutés dans la composition du matériau pour faciliter sa mise en forme (lubrifiants...), le protéger contre les agressions thermiques, chimiques ou induites par des rayonnements (antioxydants, anti UV...), ou bien encore pour modifier ses propriétés finales (plastifiant...).

Aussi, la transformation et la stérilisation des matériaux peuvent être à l'origine de dégradations ou de scissions des chaînes de polymères qui aboutissent à la formation de composés de faible masse molaire de mobilité plus élevée; par exemple, le PVC par l'action de la chaleur, subit une réaction de décomposition qui conduit à la libération d'acide chlorhydrique.

2 PHÉNOMÈNES D'INTERACTION CONTENU-CONTENANT

2.1 Aspects théoriques des mécanismes d'interaction [40,41].

Les interactions C/C sont basées sur des phénomènes d'échange; à la base d'une telle étude, il est indispensable d'avoir une bonne connaissance du matériau en contact avec le produit (informations provenant du fournisseur, éventuellement analyses complémentaires) ainsi que des propriétés physico-chimiques du produit pharmaceutique lui-même.

L'interaction entre le produit et son contenant, comme indiqué par la Figure 2.1, peut se faire par :

- a. Migration du produit vers le contenant par :
 - Adsorption : Des molécules du contenu se fixent sur les surfaces solides du contenant.
 - Absorption : C'est un processus intégrant la pénétration puis la dispersion des substances du contenu dans la matrice du contenant.
 - Perméation : Phénomène physique consécutif à l'adsorption et l'absorption, correspondant à la traversée de la matrice du contenant par les molécules du contenu.
- b. Migration du contenant vers le contenu : relargage
- c. Passage de gaz ou du liquide à travers la paroi du contenant : perméabilité.

Les interactions contenu-contenant sont régies par un grand nombre de processus physiques et dépendent notamment de la vitesse de diffusion du composé et de sa solubilité respective dans le polymère et la forme pharmaceutique et quel que soit le type d'interaction, le mécanisme mis en jeu implique un phénomène de diffusion.

Phénomènes de diffusion : La diffusion est un phénomène qui tend à homogénéiser les différences de concentrations d'un composé dans un système par migration des molécules des zones de forte concentration vers celles de faible concentration.

La sorption des constituants de la formulation dans le matériau concerne les principes actifs ainsi que les excipients ; l'adsorption physique est un processus thermodynamique spontané qui rend le système (adsorbat + adsorbant) plus stable. Elle résulte en la formation d'une couche mono moléculaire de molécules actives sur la surface du matériau. Ce phénomène est instantané et dépend de la concentration initiale du soluté, la surface du matériau mise en contact et la température. L'état d'équilibre est exprimé par des modèles dits d'isothermes d'adsorption et dont l'isotherme de Langmuir est la plus connue.

L'absorption est la deuxième étape du processus de sorption; elle correspond à la diffusion de la molécule fixée par adsorption dans la matrice polymère. En général, l'absorption, au contraire de l'adsorption, est un phénomène qui se caractérise par une cinétique lente, de l'ordre de plusieurs heures à plusieurs jours voire des mois. Cette pénétration est contrôlée par les lois de diffusion de Fick.

Loi de Fick :

$$dC/dt = (D)(d^2C/dx^2)$$

D est le coefficient de diffusion donné par l'équation

$$D = D_0 \exp(-E/RT)$$

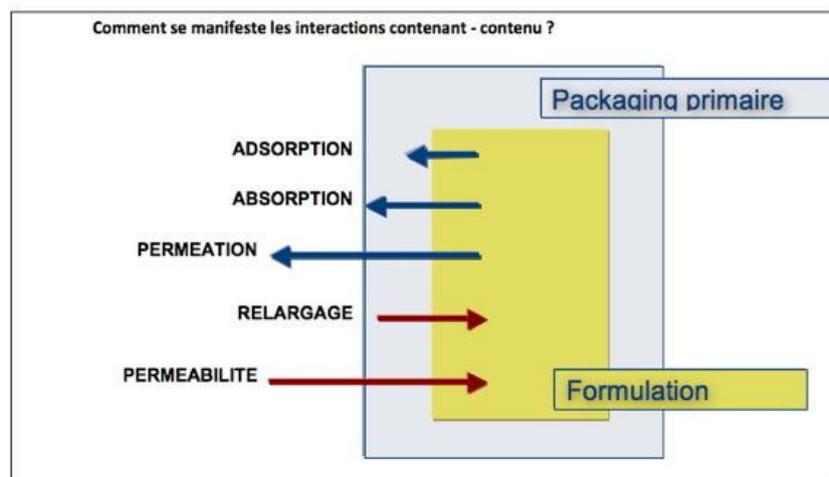


Figure 2.1 Les différents phénomènes d'interactions entre un packaging primaire et une formulation pharmaceutique

A l'interface matériau / milieu, les interactions composé/solvant entrent en jeu ce qui permet le passage de la molécule dans le milieu par dissolution ; celle-ci est caractérisée par un coefficient de partage K.

Ce coefficient est fonction de la nature et la structure chimique du migrant mais dépend surtout des propriétés du solvant (l'affinité du composé pour les deux phases par rapport à son caractère hydrophile ou hydrophobe, ou encore de son aptitude à créer des liaisons secondaires (types électrostatiques, Van der Waals et interactions hydrophile-hydrophobe,...) avec l'un ou l'autre des milieux. Ce phénomène est encore facilité par la sorption de molécules de solvant sur la surface du matériau.

Il est à noter que le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule peut être exprimé par son coefficient de partage octanol/eau qui est le couple de référence.

La cinétique de diffusion fait intervenir un coefficient de diffusion, une grandeur qui dépend de la température (T), du milieu, des caractéristiques de l'espèce qui diffuse et du matériau. La composition chimique du polymère (groupements, additifs...) et la nature de la formulation pharmaceutique (pH, présence d'excipients et leur nature,...) jouent aussi un rôle majeur.

Finalement, les phénomènes de sorption et de migration nécessitent, à la fois une force motrice déterminée par les propriétés thermodynamiques du système et une mobilité suffisante de l'espèce qui sorbe ou migre. L'importance du phénomène mis en jeu dépend essentiellement de la cinétique plus ou moins rapide de diffusion du migrant mais aussi de son coefficient de partage entre la formulation et le matériau.

2.2 Facteurs influençant les phénomènes d'interactions contenu-contenant [38, 39].

Différents facteurs influencent le phénomène de diffusion de constituants du matériau vers le milieu de contact (migration) ou de la préparation pharmaceutique vers le matériau (sorption). Ces facteurs sont propres au matériau de conditionnement, à la molécule qui diffuse, au milieu de contact et aux conditions de stockage et de stérilisation.

Morphologie et flexibilité des chaînes du polymère.

La diffusion d'une espèce dans le matériau dépend essentiellement de sa morphologie microscopique et notamment de l'arrangement des chaînes macromoléculaires, d'autres facteurs comme la polarité et l'encombrement stérique des chaînes peuvent apporter leur contribution.

Contrairement à la phase cristalline que l'on peut considérer comme imperméable, la phase amorphe favorise la diffusion des migrants grâce à son volume libre. Ce volume libre est lié à la température de transition vitreuse (T_g) du polymère et conditionne le mouvement des chaînes. En effet, les petits mouvements segmentaires possibles au-dessus de la T_g vont permettre d'accroître la vitesse de diffusion car cette mobilité des chaînes permet la création et le déplacement des micro-vides au sein de la matrice polymère. Ainsi, plus le polymère est amorphe plus la diffusion est importante. De la même façon, la cristallinité du polymère a un impact sur la sorption des constituants du milieu de contact vers le matériau. Par ailleurs, la présence d'additifs dans le matériau, comme par exemple les plastifiants, influence aussi la mobilité des chaînes et donc la T_g . Ainsi la quantité de plastifiant joue un rôle important dans l'absorption de principes actifs.

Taille et forme de la molécule qui diffuse.

La vitesse de diffusion d'une molécule dépend de sa masse molaire (qui influence sa taille) ainsi que de sa forme. Autrement dit, elle dépend du volume spécifique de la molécule.

Nature du milieu.

Il englobe les termes de polarité et de lipophilie. Les additifs ont en général un caractère lipophile et leur migration est donc favorisée en présence d'un milieu lipophile et est inversement limitée en solution aqueuse. De plus, la présence d'un plastifiant dans le polymère influence le phénomène d'absorption de principe actif car il modifie le caractère lipophile et la polarité du matériau et entraîne ainsi une modification du coefficient de partage.

Durée de contact.

La migration des additifs dépend de la durée de mise en contact du couple formulation/conditionnement.

Température de stockage.

La vitesse de diffusion est influencée par la température et cette dépendance est régie par la loi d'Arrhenius. Ainsi, la température favorise la cinétique de migration des additifs.

pH de la solution (contenu).

Il peut influencer les phénomènes de migration et de sorption. En effet, quand le pH (acide ou base) de la solution favorise l'ionisation du principe actif, son absorption dans le matériau est défavorisée car les principes actifs s'absorbent sous forme moléculaire.

Effet de l'irradiation.

Cette augmentation du phénomène de migration peut être expliquée, en partie, par la scission des chaînes macromoléculaires du polymère induite par l'irradiation aux doses indiquées. Une telle dégradation du polymère provoque l'augmentation de son volume libre, ce qui favorise la migration. A des doses plus élevées, une réticulation de la structure de polymère est observée, ce qui aboutit à diminuer le taux de migration des additifs en raison de la diminution du volume libre dans le polymère.

2.3 Aspect réglementaire.

2.3.1 Les exigences réglementaires concernant le médicament et son conditionnement primaire.

Elles s'appliquent aux différentes étapes de la vie du médicament [42-44].

- Au cours du développement lors du choix des équipements de production et du conditionnement (compatibilité, stabilité du produit et le cas échéant impact d'un traitement type stérilisation ;
- Au cours de la fabrication lors de la vérification de la conformité des récipients et fermetures aux monographies en vigueur (pharmacopées ou internes);
- Au cours de toute modification touchant tout matériau en contact avec le produit et susceptible d'impacter sur la qualité et l'innocuité du médicament.

Les exigences réglementaires sont principalement de deux types :

Informationnel: Des informations sur le matériau en contact avec le produit, tels que le nom chimique de la matière et des monomères, la composition qualitative du matériau (incluant les additifs, antioxydants, stabilisants, plastifiants, lubrifiants...), les coordonnées du fournisseur, les certificats de conformité aux pharmacopées ou à la réglementation alimentaire.

Expérimental: Il s'agit d'études spécifiques justifiant le choix du matériau en contact avec le produit. Le type et l'étendue des études sont liés aux risques potentiels d'altération de la qualité et de l'innocuité du médicament. Il s'agit des études d'interaction contenant-contenu ou ce qu'on appelle aussi études des extractibles et des relargables.

La qualité des matériaux de conditionnement est vérifiée par le service de contrôle qualité des industries pharmaceutiques car ils doivent répondre à un cahier des charges

très précis. Les méthodes d'identification, d'essais et de dosage sont, pour la plupart des matériaux, décrites dans les monographies de la Pharmacopée (Européenne et/ou Internationales).

Quant aux études d'interactions contenu-contenant (C/C), la difficulté réside dans la composition du contenant (qui est souvent inconnue et/ou maintenue confidentielle par le fabricant), à la présence de migrants à l'état de traces nécessitant des méthodes très performantes pour leur détection, à l'omniprésence de certaines substances qui posent des problèmes d'interférences (contribution du blanc) ainsi qu'à la variabilité de la préparation pharmaceutique qui dépend des conditions de stress auxquelles elle est soumise au cours de son cycle de vie (fabrication, transport, stockage).

Tous ces paramètres rendent l'élaboration d'une démarche unique et harmonisée pour l'évaluation de ces phénomènes impossible, ainsi la réglementation pour l'analyse des relargables sont limitées.

Aussi, dans la publication « Guideline on plastic immediate primary packaging materials », il ressort la difficulté d'appliquer les exigences réglementaires qui ne sont pas toujours harmonisées au niveau international. A cet effet, et afin d'aider les industriels dans leur stratégie d'études d'interactions C/C, un arbre décisionnel est proposé tenant en compte du risque propre à un contenant en fonction de sa voie d'administration (Figure 2.2) et la probabilité d'interaction avec le contenu est reportée dans le Tableau 2.1 [44, 45].

Ainsi, les contraintes réglementaires liées à l'industrie pharmaceutique ont conduit à proposer une approche scientifique et pragmatique pour évaluer la compatibilité entre contenant et contenu. Elle implique une considération du contexte d'utilisation du médicament par le patient et des risques encourus en termes de sécurité et de qualité. La méthodologie est axée sur la forme pharmaceutique et la voie d'administration, le type de matériau et les éléments disponibles (information sur le contenant, caractéristiques du produit fini, résultats de stabilité) mais elles ne donnent pas de précisions sur la manière dont ces études sont menées ni sur les critères d'acceptation.

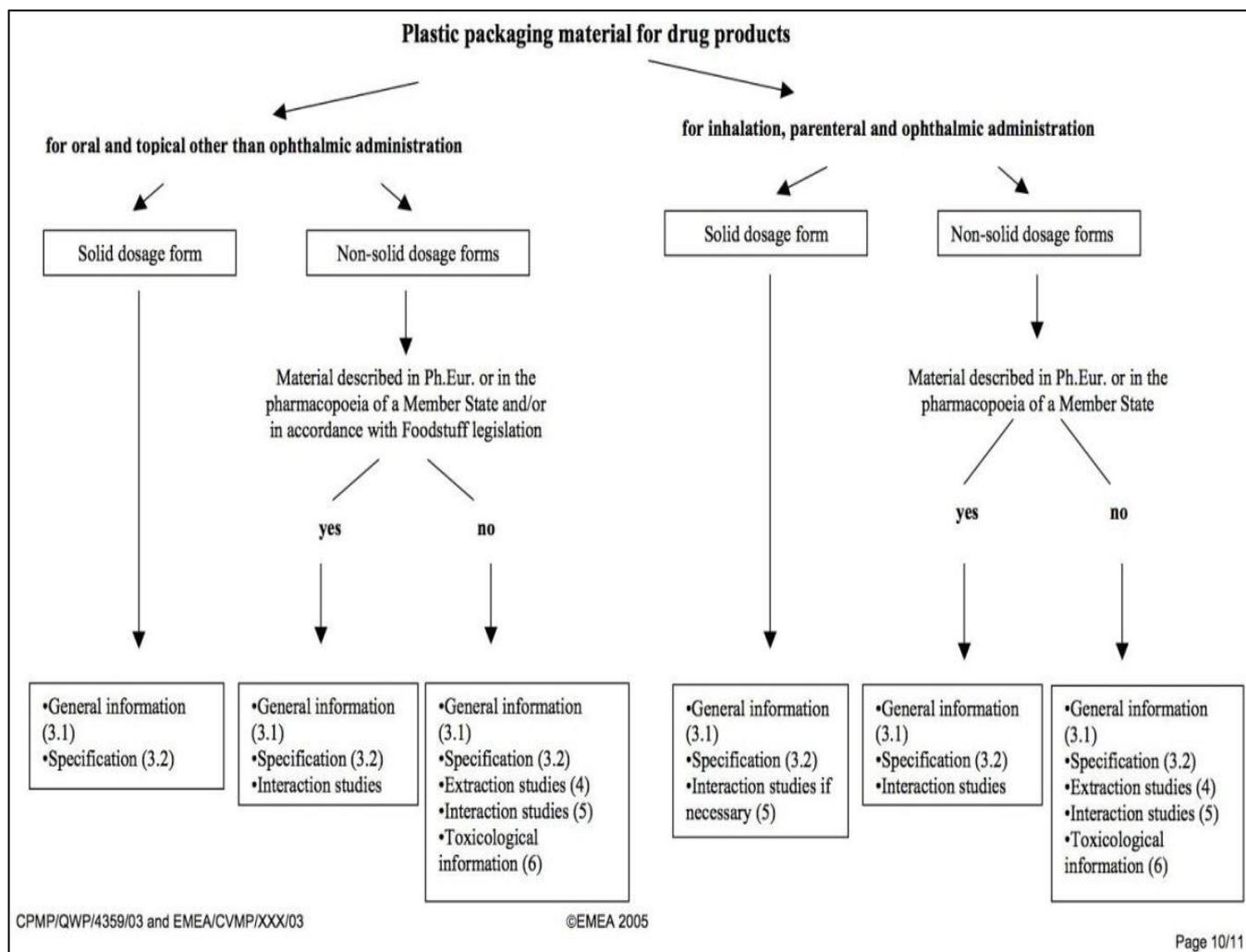


Figure 2.2 : Algorithme décisionnel pour la réalisation des études d'interaction C/C [44]

Tableau 2.1 : Risque propre à un contenant [45]

Niveau de risque en fonction de la voie d'administration	Probabilité d'interactions contenant-contenu		
	Haut	Moyen	Bas
Le plus haut	Solutions inhalées et aérosols inhalés, solutions injectables et suspensions injectables	Poudres stériles pour injection, poudres pour inhalation	
Haut	Solutions et suspensions ophtalmique, patchs transdermiques, aérosols et sprays nasaux		
Bas	Solutions et aérosols à application topique, solutions et suspensions orales	Poudres à application topique ou orale	Comprimés ou gélules

Face au manque d'arguments permettant de statuer sur le risque lié aux interactions entre le contenu et le contenant et en particulier celui induit par un phénomène de relargage, des référentiels et des recommandations sont émis par des agences ou des groupes de travail :

- Pour le classement des substances chimiques en fonction de leur toxicité [46],
- Pour établir des seuils de sécurité au-dessus duquel les substances diffusibles doivent être dosées. Ce dernier est dépendant à la fois des critères de sécurité (données toxicologiques, risques liés au produit et à la voie d'administration) et de critères analytiques (limite de sensibilité de la méthode d'analyse). Ainsi, les substances sont identifiées et quantifiées en fonction de leur seuil de sécurité exprimé en unité d'exposition journalière [47-51].

La pharmacopée européenne dispose d'un chapitre sur les matériaux de conditionnement; il décrit les principaux matériaux utilisés (Polypropylène, polyéthylène, etc...) et donne une liste d'additifs pouvant être utilisés pour la fabrication de ces contenants plastiques et leur teneur maximale autorisée. Il n'existe pas de chapitre spécifique au contrôle ou l'analyse des relargables d'une façon spécifique mais une évaluation globale de ces derniers est effectuée par la méthode spectrométrique dans l'ultra-violet [52].

La pharmacopée américaine USP et les guides STP pharma pratiques proposent une démarche basée sur l'évaluation des substances extractibles et des relargables dans les préparations pharmaceutiques associées aux contenants pharmaceutiques et aux dispositifs d'administration de médicaments mais ces textes ne font pas office de loi.

L'objectif des études des extractibles est de favoriser au maximum (dans des conditions de stress par rapport aux choix du solvant simulant mis en contact, pH, force ionique, polarité., la durée de contact, la température, etc...) le passage de composés du contenant vers le contenu pour identifier ceux qui sont susceptibles de migrer et de déterminer les techniques analytiques (d'extraction et d'analyse) à utiliser pour l'étude des relargables (menées pendant les études de stabilité du produit). En effet, devant la diversité et la multiplicité des substances extraites, le recours aux techniques analytiques les plus performantes est indispensable telles la GC/MS et LC/MS de plus, de nombreuses substances ne sont pas identifiées par manque de témoin ou standard de référence.

En général, les études d'interaction C/C sont initiées au début de la conception d'une nouvelle préparation pharmaceutique, surtout pour les préparations à haut risque. Ceci permet de choisir le contenant ayant un profil en substances diffusibles le plus favorable pour conditionner et stocker la préparation. Les études sur les relargables sont ensuite poursuivies pendant les études de stabilité sur un échantillon du lot de la préparation pharmaceutique prête à être commercialisée. Le cadre de ces études ne peut donc s'inscrire dans un ensemble rigide de méthodes d'essais et de critères d'acceptation qui pourrait apporter soit des restrictions inutiles, soit une fausse impression de sécurité.

Ces études doivent être menées au cas par cas, selon la disponibilité des données et grâce à une très bonne connaissance du médicament par les industriels et du matériau par les fournisseurs et une collaboration étroite entre les deux parties [47-51].

L'aspect toxicologique est déterminant pour se prononcer sur la compatibilité d'un contenant avec son contenu et l'élaboration des limites maximales admissibles de substances relargables. En effet, une analyse, basée sur des données fournisseur en comparaison avec les données de la bibliographie peut apporter des éléments fondamentaux à condition qu'elle soit faite par des experts en toxicologie, pour assurer une bonne interprétation des données de base.

Les substances, dont le pouvoir cancérigène (ou CMR, Cancérigène, Mutagène, toxique pour la Reproduction) est démontré, sont exclues des applications et concernant le risque d'exposition aux relargables, l'exigence réglementaire nécessite leur identification et/ou leur quantification et la confirmation de leur innocuité par des tests de toxicité et en particulier la cytotoxicité, dont la sensibilité dépasse largement celle des tests in vivo [53- 55].

2.3.2 Contexte réglementaire concernant les phtalates et le DEHP dans les dispositifs médicaux (DM).

Le DEHP est autorisé comme plastifiant dans les matériaux à usage pharmaceutique et médical à raison de 40% (m/m) [52].

Ce phtalate, contenu dans les DM peut entrer en contact avec le patient par voie entérale (nutrition entérale), par voie parentérale (transfusion, circulations extracorporelles comme, dialyse, nutrition parentérale, par perfusion de médicaments et particulièrement ceux à caractère lipophile) et dans une moindre mesure par voie pulmonaire (oxygénothérapie, ventilation artificielle) [56].

- Dans la directive 2007/47/CE relative aux dispositifs médicaux, il est stipulé que « Les dispositifs doivent être conçus et fabriqués de manière à réduire au minimum les risques découlant des substances dégagées par le dispositif. Une attention particulière doit être accordée aux substances carcinogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction conformément à l'annexe I de la directive 67/548/CEE [57].
- Par ailleurs, le règlement 1272/2008 de l'Agence Européenne des Produits Chimiques a classé les phtalates DEHP, BBP, DIPP et DBP comme des substances à risque pour la reproduction (Repro2 selon la directive 67/548/CEE) et (Repro1B selon le règlement 1272/2008) [58].
- SCENIHR, dans son rapport, confirme la toxicité animale du DEHP et de certains phtalates indiquant que les doses auxquelles les patients sont exposés soulèvent l'inquiétude même en l'absence de preuves cliniques ou épidémiologiques d'effets délétères pour l'homme; Aussi, il définit des populations particulières à haut risque d'exposition et les actes à haut risque d'exposition pour le patient [59].
- L'ANSM (2009) recommande la vigilance quant à l'utilisation des DM en PVC plastifié avec du DEHP; cependant, tous les DM ne présentent pas le même risque vis à vis des malades, et certains patients sont plus sensibles que d'autres. Il est convenu de définir les DM les plus à risque, les populations les plus exposées, afin de réaliser une substitution progressive des DM en PVC plastifié avec du DEHP [60].
- La Directive 2005/84/CE a interdit la mise sur le marché de jouets et d'articles de puériculture destinés à être mis dans la bouche par des enfants de moins de 3 ans, contenant certains phtalates (DINP, DEHP, DBP, DIDP, DNOP et BBP) [22].
- Et enfin, la loi n°2012-1442 du 24 décembre 2012 a interdit l'utilisation de tubulures, comportant du DEHP dans les services de pédiatrie, néonatalogie et de maternité et la norme EN 15986: 2011 exige l'étiquetage de dispositifs médicaux contenant les phtalates [23, 61].

Des études toxicologiques démontrant les risques des phtalates et particulièrement le DEHP sont très nombreuses mais ce dernier continue à être utilisé et autorisé dans les dispositifs médicaux [26, 62-65].

3 MÉTHODOLOGIE ANALYTIQUE

Le contrôle de la qualité des matériaux de conditionnement plastiques consiste à vérifier l'identité du matériau (polymère) et son degré de pureté en évaluant les autres constituants présents que ce soit des additifs ou des impuretés de synthèse comme les monomères ou les métaux lourds.

Pour ce faire, diverses méthodes d'analyse sont utilisées précédées souvent par des extractions dont certains sont exposés dans ce chapitre.

3.1 Méthodes d'extraction [35].

Bien que les techniques de séparation et de détection soient de plus en plus performantes, l'analyse d'échantillons surtout de contaminants, nécessite généralement une étape de prétraitement. Celle-ci peut avoir différents objectifs comme la pré-concentration des solutés en trop faibles teneurs pour être détectés ou encore la purification de l'échantillon lorsque la matrice est trop complexe ou présente des interférents.

Les méthodes utilisées mettent en jeu des principes très différents selon les propriétés physico-chimiques des composés à extraire et la matrice de l'échantillon (liquide, solide...).

Bon nombre de ces méthodes sont basées sur des technologies anciennes comme l'extraction liquide/liquide par solvant. Cette technique est pourtant encore très utilisée car elle fait l'objet de nombreuses normes. Cependant, elle présente certains inconvénients comme l'entretien de la verrerie, l'utilisation de solvants organiques parfois toxiques et le nombre d'étapes d'extraction qui peuvent conduire à des pertes.

Actuellement, la tendance est plutôt de s'orienter vers des protocoles rapides, peu coûteux, éventuellement automatisables (sur sites dans le cas d'effluents industriels) et permettant de réduire le volume de solvants utilisés afin de minimiser les risques liés à la santé et à l'environnement. La micro extraction, l'extraction assistée aux ultrasons, ... sont des méthodes alternatives et prometteuses dans le domaine de la chimie verte [66].

Dans cette partie sont développés quelques procédés d'extraction utilisés dans le domaine des matières plastiques et des contaminants provenant de phénomènes de relargage à partir des articles de conditionnement.

3.1.1 Extraction au soxhlet :

Ce procédé permet de faire l'extraction par solvant en continu, d'une espèce chimique contenue dans un solide. L'extracteur se compose d'un corps en verre dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais, d'un tube siphon et d'un tube d'adduction.

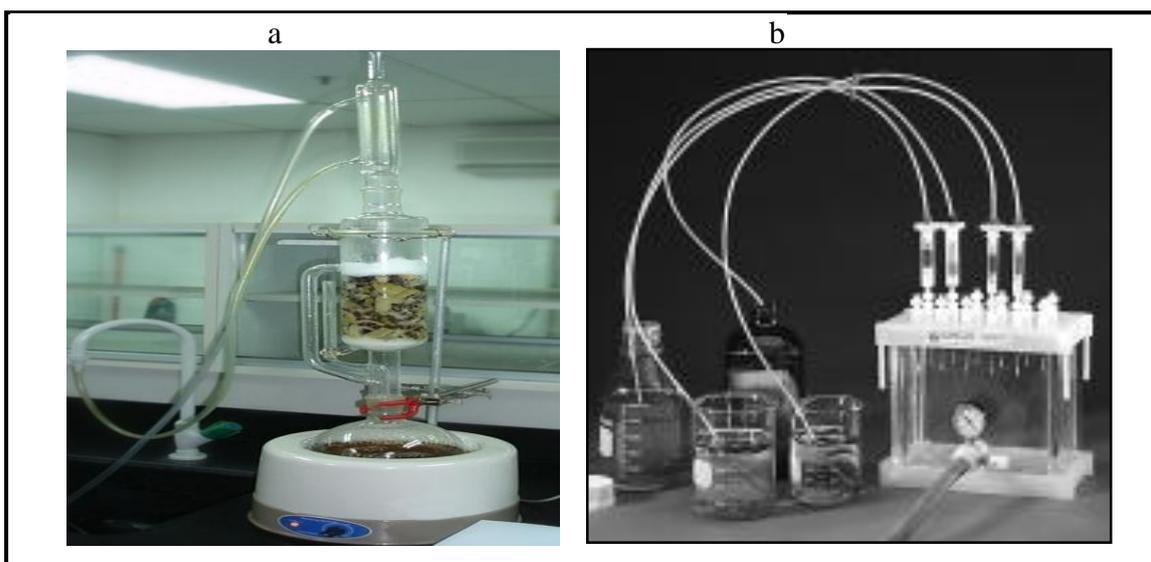


Figure 3.1 : Dispositifs d'extraction (a) Soxhlet, (b) SPE.

Dans le montage (Figure 3.1), l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Il est insérée une cartouche dans laquelle est placé l'échantillon solide contenant l'espèce à extraire et un réfrigérant est adapté au-dessus; il est également souhaitable d'utiliser un chauffe-ballon avec agitation magnétique intégrée, afin d'éviter des à-coups d'ébullition qui provoquent une remontée du liquide contenu dans le ballon et non de vapeurs de solvant pures.

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous).

Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles.

Le solvant continue alors de s'évaporer, alors que les substances extraites restent dans le ballon (leur température d'ébullition doit être nettement supérieure à celle du solvant extracteur).

Avantages.

Le cycle se répète indéfiniment. On peut ainsi épuiser complètement le solide en quelques cycles sans intervention. Le résultat est équivalent à une série de macérations successives, mais cette technique ne nécessite pas un grand nombre d'opérations.

Aussi le nombre d'opérations de manipulation est réduit et la méthode est plus économe puisqu'elle requiert nettement moins de solvant que la méthode des macérations successives pour une même efficacité d'extraction. Le solvant est constamment distillé, de sorte qu'il ne se sature jamais. Même si la substance extraite est en trop grande quantité par rapport au solvant et qu'elle dépasse sa solubilité maximale, c'est toujours du solvant pur qui retombe de l'évaporateur.

Inconvénients.

La taille de la cartouche étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives avec plusieurs cartouches, ce qui peut prendre un temps considérable. L'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques.

3.1.2 Extraction liquide-liquide (LLE).

Elle repose sur la différence d'affinité d'un soluté entre deux phases liquides non-miscibles. Considérons un soluté A en solution dans l'eau à extraire par une phase organique non-miscible à l'eau. Lorsque les deux phases liquides sont en contact il s'établit l'équilibre de partage suivant pour A (Figure 3.2). Cet équilibre est caractérisé par une constante thermodynamique K_p appelée coefficient de partage. L'extraction sera d'autant plus efficace que le coefficient de partage est grand; il faut pour cela choisir un solvant d'extraction dans lequel le soluté est très soluble.

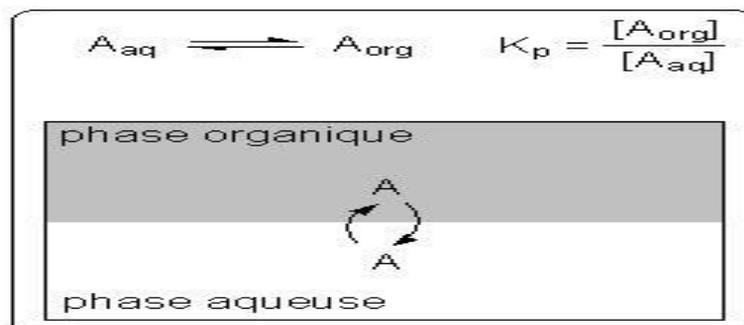


Figure 3.2. Équilibre de partage d'un soluté A entre deux phases liquides non-miscibles (aqueuse et organique)

Aussi les extractions multiples sont plus efficaces que l'extraction simple pour un même volume de solvant. Au niveau des laboratoires, cette opération est réalisée dans une ampoule à décanter, les deux liquides séparent les solutés en fonction de leur solubilité dans chaque solvant [67].

3.1.3 Extraction sur phase solide (SPE) [68 -71].

Par ce procédé, il est possible d'extraire des micropolluants dans une large gamme de propriétés physico-chimiques (molécules non ionisées de différentes volatilités, molécules ionisées...) grâce à l'utilisation d'une grande variété de phases solides (adsorbants), semblables à celles utilisées en chromatographie liquide dont le choix repose sur la nature du soluté. L'extraction sur phase solide est fondée sur la distribution des composés entre une phase solide (adsorbant) et une phase liquide (échantillon).

La procédure comporte les étapes suivantes :

Etape de conditionnement de l'adsorbant contenu dans la cartouche d'extraction. Cette étape permet de mouiller le support en solvatant les groupements fonctionnels présents à sa surface. Ainsi un support hydrophobe est tout d'abord mouillé par un solvant organique, puis par un solvant de polarité similaire à celle du solvant constituant l'échantillon, généralement l'eau (ou un mélange eau-solvant organique).

Etape de percolation de l'échantillon sur le support. Les interférents n'ayant aucune affinité avec la phase solide ne sont pas retenus sur le support lors de cette étape. Par contre, les molécules cibles et éventuellement des composés présentant une forte affinité avec l'adsorbant sont fixés sur le support (adsorption sélective). Le volume d'échantillon percolé peut varier en fonction des teneurs micropolluants recherchés.

Etape de lavage (supplémentaire et non systématique). Elle est effectuée de manière à éliminer les composés interférents faiblement retenus par le support. On choisira de ce fait un solvant de faible force éluante de façon à éluer les interférents tout en gardant fixés les composés d'intérêt.

Etape d'éluion des composés ciblés. Elle est réalisée en faisant percoler un solvant spécifiquement choisi pour rompre les interactions mises en jeu entre les analytes d'intérêt et le support solide en évitant, dans la mesure du possible, d'éluer des composés interférents fortement retenus sur le support. L'éluion est réalisée par gravité, aspiration par pression, ou mise sous vide en flux contrôlé (Figure 3.1).

Une séparation efficace par SPE dépend en premier lieu du choix approprié de la phase solide adsorbante (nature, granulométrie..) et des solvants pour l'élution. Après avoir considéré la nature chimique et la polarité des composants de l'échantillon et le solvant dans lequel ils sont dissous. La cartouche ou la colonne chromatographique remplie (par analogie) doit être homogène et exempte de vide afin d'assurer une efficacité maximale en matière de contact avec l'échantillon, des propriétés de rétention reproductibles et une bonne sélectivité.

Le développement de nouveaux polymères a permis d'obtenir une nouvelle génération de matériaux sorbants offrant un meilleur transfert de masse, des possibilités supplémentaires pour l'interaction des analytes avec les groupes fonctionnels, et une meilleure rétention améliorant la capacité d'extraction des analytes. Aussi, ces méthodes offrent la possibilité d'automatisation et de couplage (SPE/LC et SPE/GC) et la capacité de traiter un nombre élevé d'échantillons, ce sont les raisons principales de leur utilisation croissante pour l'analyse en routine de composés cibles et la surveillance en continu de la qualité de l'eau.

3.1.4 Extraction par dissolution et précipitation.

La précipitation d'une solution, ou la re-précipitation, requiert l'utilisation d'un bon solvant de la matrice polymérique.

Une fois dissoute, cette matrice peut être précipitée par simple refroidissement, comme dans le cas des polyoléfines ou avec l'apport d'un non-solvant approprié. Dans ce dernier cas, la solution est versée dans une solution en excès d'un non solvant pour le polymère mais un bon solvant pour les additifs (habituellement du méthanol, éthanol ou acétonitrile). Les additifs restent dans la phase liquide et sont séparés par filtration puis analysés [35].

3.1.5 Extraction par filtration et centrifugation.

Si le polymère contient des composantes insolubles (comme des charges minérales) elles peuvent généralement être enlevées par filtration (après décantation) ou centrifugation.

En général, ces procédés permettent de séparer deux phases liquides, une phase solide en suspension dans une phase liquide ou deux phases liquides contenant une troisième phase solide en s'appuyant sur la différence de densité des phases en présence et en se basant sur la force de gravitation et la force centrifuge [35, 72].

3.2 Les méthodes d'analyse physico-chimiques [35, 36, 73].

La chimie analytique a pour objectif de développer ou d'appliquer des méthodes dans le but d'acquérir des informations sur la nature, la structure, la composition et la teneur de composés présents dans des échantillons variés et d'interpréter les informations recueillies. Différentes méthodes d'analyse sont utilisées au niveau des laboratoires pharmaceutiques pour les contrôles de la qualité des produits pharmaceutiques, matières premières, produits finis et articles de conditionnements.

3.2.1 Méthodes spectrométriques.

La spectroscopie est la science qui traite des interactions de différents types de rayonnement avec la matière. Elles peuvent être classées selon le processus de mesure de l'absorption ou l'émission du rayonnement électromagnétique et l'interaction peut causer une excitation ou transition entre les niveaux d'énergie des atomes ou des molécules. Le type d'excitation dépend de la longueur d'onde de la lumière.

Les électrons se déplacent vers une orbitale de niveau plus élevé par l'effet de la lumière ultraviolette ou visible, les vibrations moléculaires sont excitées par la lumière infrarouge, et les rotations sont excitées par les micro-ondes (Figure 3.3).

Un spectre d'absorption représente l'absorption de la lumière en fonction de la longueur d'onde, il peut être atomique ou moléculaire. Il dépend de la structure et peut être utilisé à des fins d'identifications de composés.

La mesure de la concentration d'une espèce absorbante dans un échantillon est réalisée par l'application de la loi de Beer-Lambert.

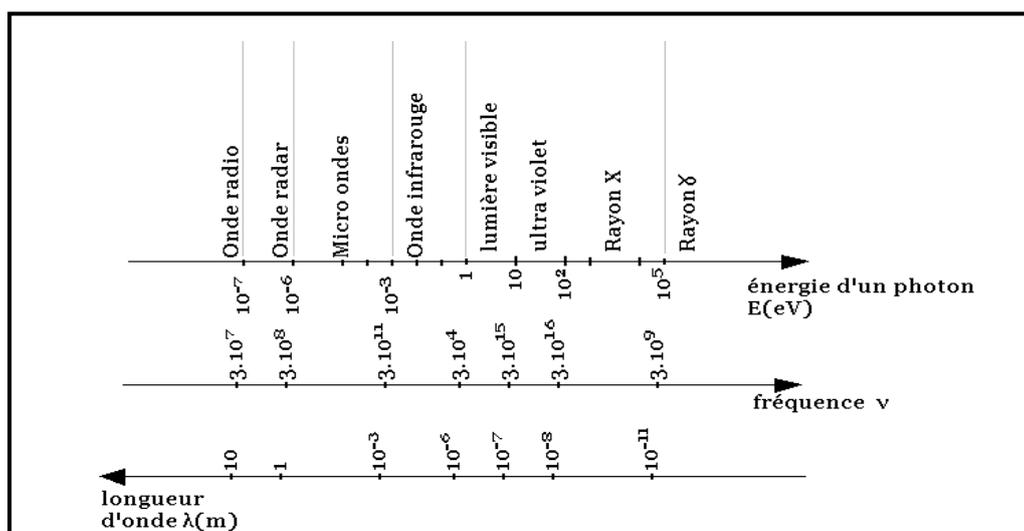


Figure 3.3 : Domaine du spectre électromagnétique

Dans le processus d'absorption, la transition entre deux niveaux ou états énergétiques ne peut avoir lieu que si la différence d'énergie correspond exactement à l'énergie des photons. L'expression reliant l'énergie d'un photon à la fréquence de la radiation est :

$$\Delta E = h\nu$$

E étant l'énergie en joules (J), **ν** est la fréquence en sec^{-1} et **h** est la constante de Planck. L'énergie absorbée est rapidement perdue par collisions sous forme de chaleur permettant au système de retourner à l'état fondamental. Elle peut aussi être réémise quelques millisecondes plus tard sous forme de radiation lumineuse.

a. Analyse quantitative par spectrométrie.

Si un flux de lumière monochromatique d'intensité I_0 traverse une substance, une partie du flux est absorbée et la quantité de lumière absorbée dépend du nombre d'ions ou de molécules.

Aussi, le degré de diminution de l'intensité de la lumière dépend de la nature de la substance absorbante et du trajet optique traversée par la lumière. Cette dépendance est représentée par la loi de Beer Lambert dont l'expression est :

$$\log(I_0/I) = \epsilon l C = A$$

A représente l'absorbance ; l, trajet optique (exprimé en cm) et ϵ le coefficient d'absorption ou d'extinction molaire ou massique (exprimé en $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ou $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$) et dépend de la nature de la substance absorbante (à une longueur d'onde λ donnée).

b. La spectrométrie moléculaire dans l'Ultraviolet et visible (UV-visible).

Dans cette région, le spectre d'absorption de radiations électromagnétiques est dû aux transitions électroniques dans différents types de groupements fonctionnels se trouvant dans une molécule.

La transition électronique est le passage d'un électron d'une orbitale moléculaire à une autre d'énergie supérieure (Figure 3.4), accompagnée d'un changement de niveaux de vibration et de rotation. Les transitions électroniques les plus fréquentes viennent d'orbitales π ou n vers des orbitales π^* avec la probabilité d'une transition ($\pi \rightarrow \pi^*$) plus grande. Elles sont présentes dans des molécules insaturées et le groupement responsable de l'absorption est désigné par chromophore.

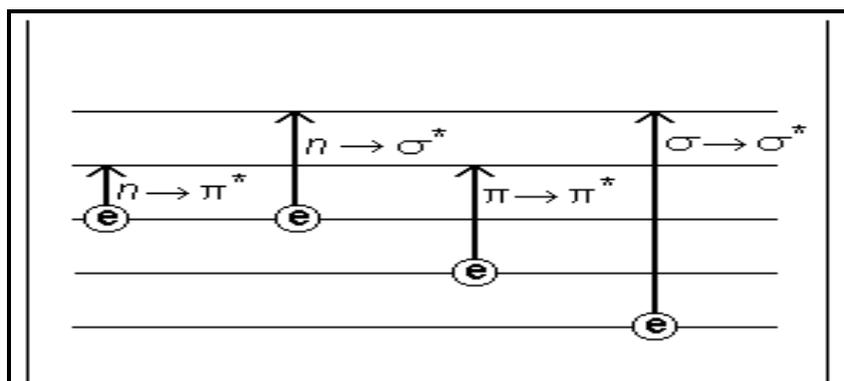


Figure 3.4 : Type de transitions électroniques dans une molécule.

c. La spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge IR.

Le domaine de l'infrarouge s'étend de $0,8\mu\text{m}$ à $1000\mu\text{m}$. Il est arbitrairement divisé en 3 catégories, le proche infrarouge ($0,8$ à $2,5\mu\text{m}$ soit 12500 - 4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge ($2,5$ à $25\mu\text{m}$ soit 4000 - 400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (25 à $1000\mu\text{m}$ soit 400 - 10 cm^{-1}), le domaine le plus exploité en analyse étant le moyen infra rouge.

Le principe de cette méthode est basé sur l'interaction de la lumière IR avec le nuage électronique des liaisons chimiques. Le rayonnement émis peu énergétique, induit des transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle de la molécule. En effet, il excite les modes de vibration (déformation, élongation) spécifiques des liaisons chimiques et la comparaison entre les rayonnements incident et transmis à travers l'échantillon permet de déterminer les principales fonctions présentes dans la molécule.

Chaque espèce moléculaire a un spectre d'absorption IR unique (à l'exception de molécules chirales à l'état cristallin) et de ce fait, cette méthode trouve son utilité la plus évidente pour l'identification de molécules très variées, organiques et organométalliques.

La molécule est modélisée comme un ensemble d'atomes reliés entre eux par des ressorts. Les deux masses m_1 et m_2 sont liées par un ressort caractérisé par la constante de force k (Figure 3.5).

Pour un ressort à l'échelle atomique, l'énergie ne peut prendre qu'un certain nombre de valeurs discrètes appelées niveaux d'énergie vibrationnelle. Chaque ressort vibre à une fréquence donnée qui dépend du groupe chimique impliqué dans la liaison.

L'énergie d'un rayon lumineux incident ne peut être absorbée que lorsque la fréquence de la lumière est identique à la fréquence propre de la vibration de la liaison intermoléculaire. On distingue plusieurs types de vibrations intermoléculaires, vibration de valence ou d'élongation, (dans l'axe des atomes mis en jeu, symétriques ou asymétriques), les vibrations de déformations ou angulaires (dans le plan ou hors du plan). A chaque vibration correspond une fréquence caractéristique, mais seuls les mouvements qui entraînent une variation du moment dipolaire électrique, donnent lieu à des bandes d'absorption dans l'IR.

Ces modes fondamentaux sont responsables des principales bandes d'absorption retrouvées dans les spectres et la fréquence de la vibration fondamentale qui dépend de la masse des atomes et la force de la liaison, est donnée par l'expression (Figure 3.5) suivante :

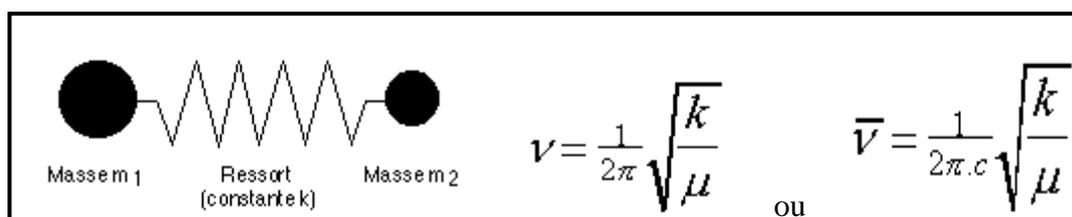


Figure 3.5 : Fréquence fondamentale d'une molécule diatomique

Avec :

c : vitesse de la lumière, ν : fréquence fondamentale de la liaison,

$\bar{\nu} = 1/\lambda$: fréquence exprimée en nombre d'ondes,

k : constante de force de la liaison,

μ : masse réduite du couple d'atomes mis en jeu qui est donnée par la formule :

$$\mu = (m1 \cdot m2 / m1 + m2).$$

Les échantillons peuvent être analysés à l'état brut ou dilués dans des solvants appropriés; ils sont analysés directement (cas des films plastiques), ou sous forme de pastilles (solides) ou encore dans des cellules (cas des liquides et gaz).

L'interprétation des spectres en IR se fait généralement par l'attribution de nombres d'ondes aux différentes bandes d'absorption observées et leur identification par rapport aux tables relatives aux vibrations fondamentales de liaisons chimiques ou groupements fonctionnels aussi, par comparaison aux spectres de références (dans le cas d'identification de matières premières dans l'industrie pharmaceutique).

Grâce au développement instrumental, cette technique a nettement été améliorée pour des utilisations très variées dans les domaines pharmaceutique, agroalimentaire, matériaux, polymères et environnement par l'utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la spectrométrie à réflexion totale atténuée (ATR) surtout couplée à la chromatographie [74].

3.2.2 Méthodes chromatographiques.

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique qui permet de séparer les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la (ré) partition sélective des solutés entre ces deux phases.

Chaque soluté est soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité ou élution (due à la phase mobile).

Les facteurs qui interviennent pour la séparation des différents solutés dans un système chromatographique sont la solubilité, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers...

Le type de chromatographie est défini du fait que l'on a privilégié l'effet d'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

On distingue différents types de chromatographie, la chromatographie en phase liquide LC ou en phase gazeuse GC (selon que l'éluant est un liquide ou un gaz) et on retrouve la chromatographie de partage, d'adsorption, d'échanges d'ions, d'exclusion ou perméation de gel...selon la nature, l'effet ou le mécanisme mis en jeu avec la phase stationnaire.

Selon leurs affinités respectives entre les deux phases stationnaire et mobile, les solutés sont plus ou moins retenus et sont identifiés dans le chromatogramme grâce à leur temps de rétention; une bonne élution est vérifiée par la forme gaussienne du pic chromatographique obtenu (Figure 3.6).

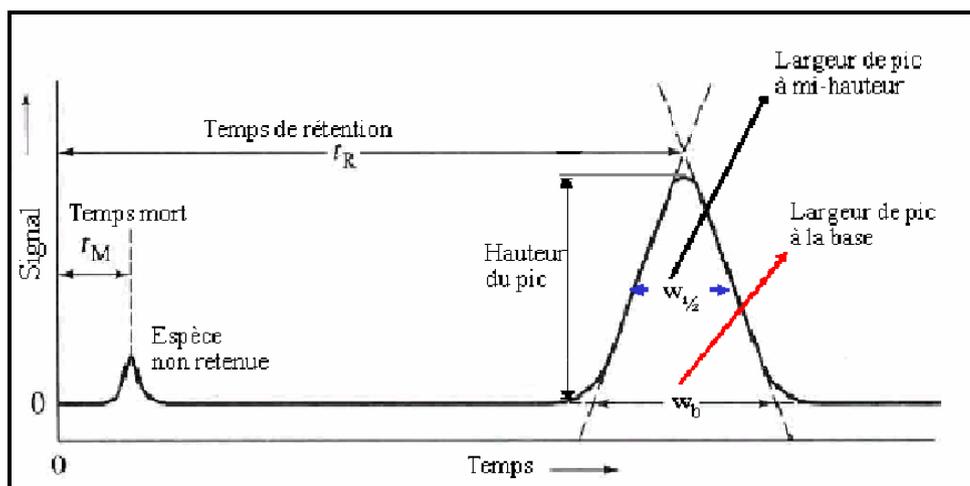


Figure 3.6 : Grandeur physiques d'un pic chromatographique.

Dans cette figure, le premier pic est celui de l'air, il permet d'identifier le temps mort noté t_M ou t_0 (temps mis par une espèce non retenue pour parcourir le système chromatographique depuis l'injecteur jusqu'au détecteur).

Chaque pic chromatographique est caractérisé principalement par son temps de rétention (temps de sortie de la colonne) noté t_r et sa largeur à mi-hauteur $d_{1/2}$ (ou $w_{1/2}$) et la bonne séparation chromatographique est évaluée par le paramètre résolution notée R et donné par l'expression:

$$R = 2(tr_2 - tr_1)/(w_1 + w_2) \quad (\text{Séparation acceptable si } R > 1.5).$$

La chromatographie est exploitée à des fins quantitative par utilisation de la relation de linéarité qui lie la réponse du détecteur (ou surface du pic) à la concentration (ou la masse) du soluté.

a. La chromatographie en phase gazeuse CPG.

Cette méthode est appliquée pour la séparation de composés qui peuvent être vaporisés sans décomposition (volatils et non thermosensibles).

Les solutés sont séparés par entraînement au moyen d'une **phase mobile** (gaz vecteur inerte ou non réactif) le long d'une **phase stationnaire** (solide ou liquide fixée sur de la silice) grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases.

Les composants sont vaporisés dans l'injecteur (Figure 3.7) et maintenus sous forme gazeuse grâce à un four réglable (isotherme ou en programmation de température); ces derniers interagissent avec la phase stationnaire et selon leur affinité, ils sont plus ou moins retenus et sont séparés.

Plusieurs détecteurs sont utilisés, les plus courants sont les détecteurs à ionisation de flamme (FID), conductibilité thermique (TCD), capteur d'électrons (ECD) ou spectromètre de masse (SM).

b. Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC.

La chromatographie en phase liquide est caractérisée par le fait que la phase mobile est un liquide et la phase stationnaire est immobilisée dans une colonne.

Cette technique rivalise avec la CPG car elle permet de réaliser des séparations aussi fines et aussi rapides. Tous les types de chromatographie (adsorption, partage, échange d'ions, etc..) sont adaptables à la HPLC à condition que le soluté soit soluble dans la phase mobile.

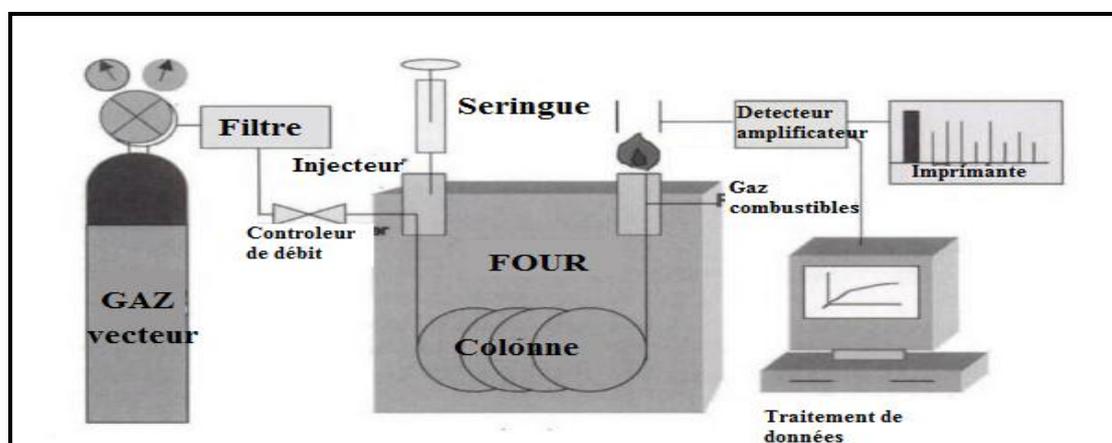


Figure 3.7 : Schéma d'un système chromatographique.

L'HPLC a un pouvoir de séparation très élevé; son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne (phase stationnaire) mais surtout de la phase mobile (qui peut être constituée d'un solvant, mode isocratique ou d'un mélange de solvants, mode gradient) qui permet de varier la polarité et la viscosité de cette dernière.

Les différentes interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire qui en découlent permettent de séparer les solutés selon leur affinité entre les deux phases; ils sont caractérisés par leur temps de rétention. Différents détecteurs sont utilisés (UV- visible, électrochimie, réfractométrie, FTIR, SM).

c. La chromatographie sur couche mince.

La chromatographie sur couche mince est une technique d'analyse très utile; elle permet de séparer et d'identifier les espèces chimiques dans un mélange.

Il s'agit de déposer quelques μL une solution sur une plaque CCM (en verre, aluminium, plastique) recouverte d'une phase stationnaire solide ou un support imprégné d'un liquide; la plaque est placée dans une cuve chromatographique contenant la phase mobile liquide constituée d'un solvant ou d'un mélange de solvants (Figure 3.8) et l'éluion se fait par capillarité. Les constituants du mélange sont départagés entre les deux phases et migrent à des vitesses différentes selon leur nature. Chaque soluté est caractérisé par la distance parcourue sur la plaque.

Les tâches correspondantes aux solutés sont observées directement sur la plaque quand elles sont colorées sinon, celles-ci sont révélées sous une lampe UV (par utilisation de plaques fluorescentes) ou par une réaction chimique de complexation.

L'identification des solutés est réalisée grâce au rapport frontal ou facteur de rétention donné par l'expression :

$$R_f = d/D$$

D : distance parcourue par la phase mobile,

d : distance parcourue par le soluté.

Cette technique permet de déterminer le nombre d'espèces dans un échantillon, d'identifier des espèces en comparant les R_f avec ceux de substances de référence et de vérifier la pureté des composés.

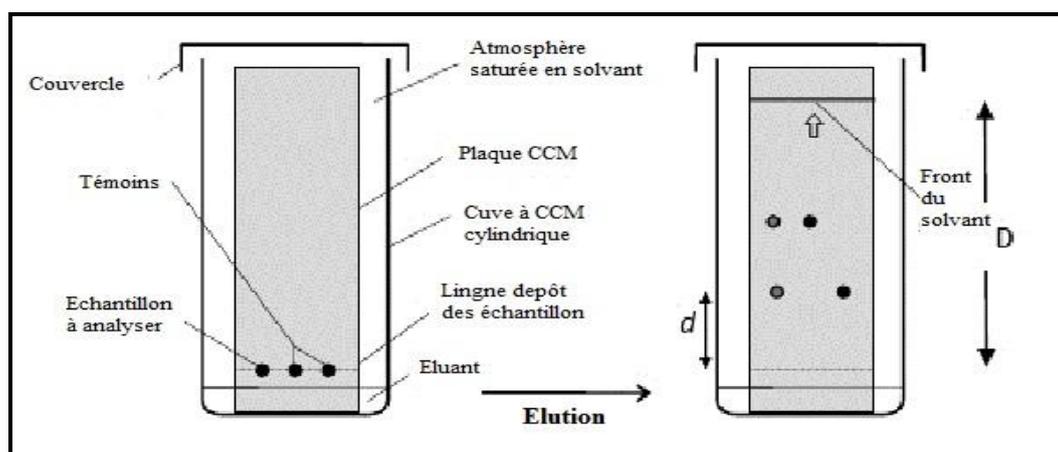


Figure 3.8 : Chromatographie sur couche mince

d. La chromatographie couplée à la spectrométrie de masse GC-MS ou LC-MS.

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires.

Le couplage à une méthode de séparation (chromatographie) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe.

➤ **Principe de la spectrométrie de masse.**

Après séparation, le composé introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV (ce potentiel est suffisant pour ioniser les molécules et rompre les liaisons). L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ou réarrangement ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

Un spectromètre de masse comprend une source d'ions (pour convertir les molécules en ions), d'un analyseur de masse (qui trie les ions et dirige leur mouvement vers le détecteur) et le détecteur qui mesure la quantité ou l'abondance relative de chaque ion et qui est liée au nombre de fois qu'un ion de rapport m/z donné frappe le détecteur (Figure 3.9).

L'outil GC-MS ou LC-MS offre une plus grande fiabilité en matière d'identification ou de confirmation d'un analyte par le biais de mesure précise du temps de rétention et du rapport m/z des ions après fragmentation (exemple des spectres de masse des isomères DEHP et DOP illustré dans la Figure 3.10).

Les spectres de masse sont souvent reproductibles et peuvent constituer ainsi des bases de données (bibliothèque de spectres de référence) qui sont introduites directement dans les équipements à des fins de comparaison [75].

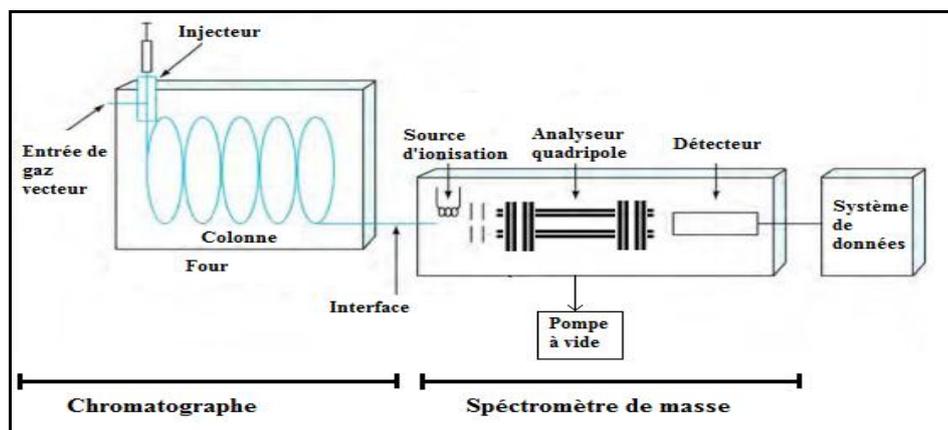


Figure 3.9 : Schéma simplifié d'un GC-MS.

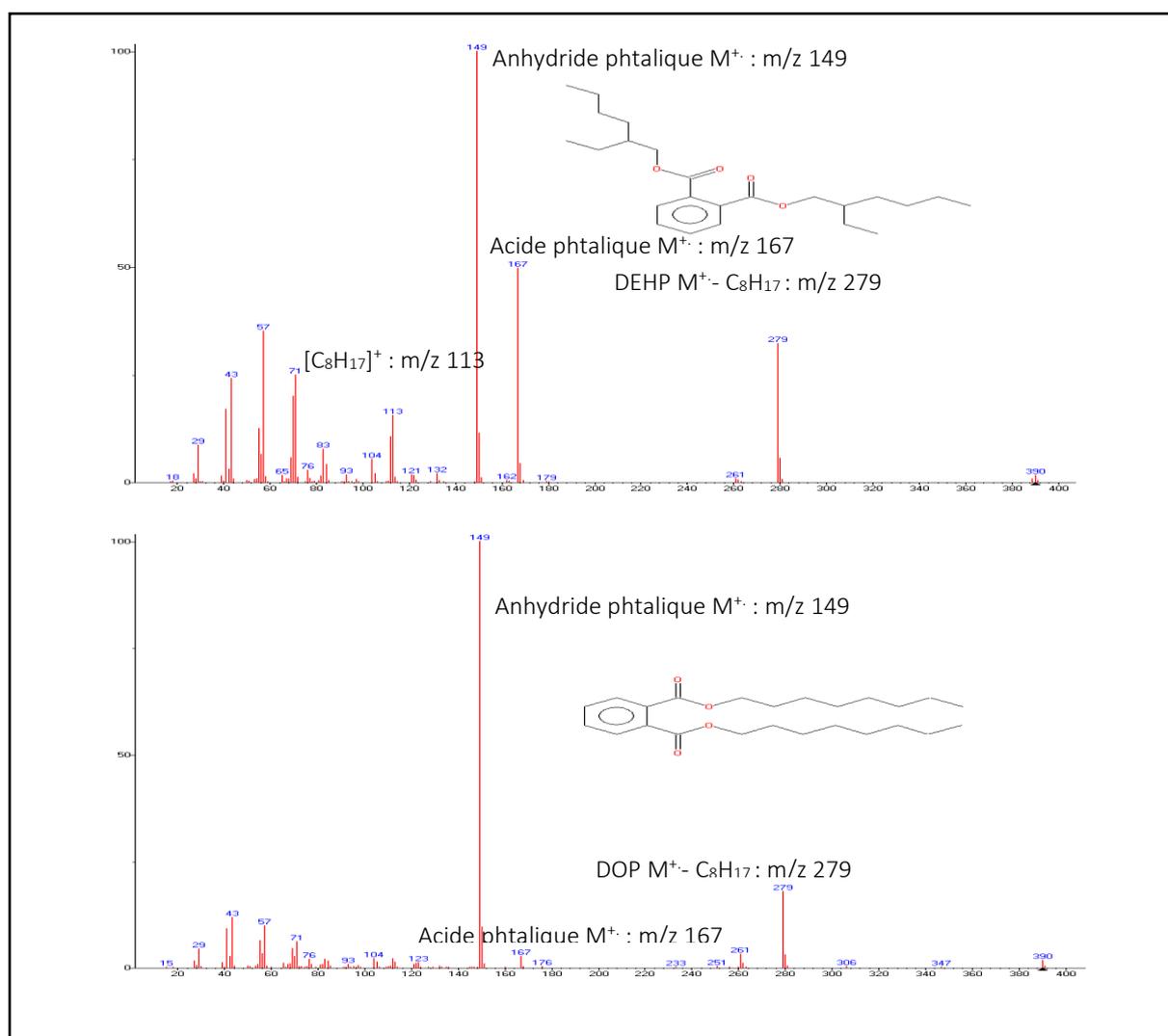


Figure 3.10 : Spectres de masse du DEHP et du DOP (nist.gov 2017).

4 LA VALIDATION ANALYTIQUE

Le principe des procédures analytiques est largement répandu dans tous les domaines d'activité, chimie, pharmacie, biopharmacie, agroalimentaire, environnement, cosmétologie ou des mesures sont réalisées; cependant, la question d'acceptabilité de la procédure analytique pour une application donnée reste non résolue dans bien des cas et ce malgré les diverses réglementations relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF, GMP..) et d'autres documents à caractère normatif (ISO, ICH, FDA, etc.).

Il existe en effet de nombreux documents officiels décrivant les exigences et critères de validation à tester mais les protocoles expérimentaux et les limites d'acceptation ne sont pas souvent harmonisés [76-80].

4.1 Validation d'une méthode analytique.

L'objectif d'une validation analytique est d'évaluer les caractéristiques/paramètres d'une méthode analytique afin de fournir un niveau de confiance scientifique acceptable qui convienne à l'emploi visé. Ceci signifie que pour un essai ou test réalisé par un analyste formé à cet effet utilisant l'équipement et les matériaux spécifiés et suivant exactement le protocole de la méthode, des résultats fiables et cohérents peuvent être obtenus dans les limites statistiques spécifiées pour l'analyse d'un échantillon.

C'est une fois l'objectif de la validation défini que les caractéristiques de validation à évaluer sont fixées ainsi que les limites d'acceptation.

La méthode d'analyse peut porter sur une identification, un dosage du composé (analyte), seul ou dans une matrice (après une extraction) ou une vérification de la teneur limite des impuretés.

Dans le domaine de l'environnement, les laboratoires ont développé des méthodes internes pour l'analyse des contaminants organiques (eau, air, sols) permettant d'identifier et de quantifier simultanément de très nombreux composés de propriétés physico-chimiques différentes désignées par « méthodes multi-résidus » .

Ces méthodes font intervenir des protocoles d'extraction et des techniques d'analyse performantes (sensibles et sophistiquées) et différentes d'un laboratoire à l'autre selon le domaine d'activité et peuvent être sujettes à des interférences risquant de conduire à des résultats erronés (faux positif ou faux négatif).

Cependant devant l'étendue et la variété de ces méthodes, le nombre croissant de composés organiques à suivre dans les programmes de surveillance et leur grande variété de propriétés physico-chimiques, il apparaît nécessaire de mettre en place un cadre pour favoriser la comparabilité des données issues de ces protocoles de mesures en définissant les exigences métrologiques applicables à ces méthodes quand elles sont mises en œuvre et d'identifier les éléments de validation nécessaires selon différents guides par rapport à l'objectif visé et le domaine d'application [81- 84].

Dans le cadre des programmes de surveillance (expertise), l'accréditation par le COFRAC (comité français d'accréditation) de ces méthodes permet aussi aux laboratoires de faire reconnaître leur savoir-faire en matières de développement et de validation de méthodes analytiques et constitue un gage de qualité pour les clients et donneurs d'ordre [84].

4.2 Critères de validation d'une méthode d'analyse [83, 84].

La validation est une opération qui consiste à établir un ou plusieurs des critères de performance suivants : précision, linéarité, limites de détection, limites de quantification, spécificité, robustesse, suivant le type de l'essai et avec des limites d'acceptation définies.

➤ La spécificité.

C'est l'habilité à évaluer sans équivoque l'analyte parmi les composants présents dans l'échantillon ; elle doit être telle que toute interférence n'ait aucune influence sur la performance de la méthode ; elle s'évalue grâce à l'utilisation d'un placebo (blanc) ou des standards dopés dans une matrice non contaminée dans le cas de méthodes multi-résidus. Aussi les contaminations provenant de l'environnement du laboratoire, du matériel ou équipement de mesure, les produits de nettoyage, impuretés de réactif, etc. doivent être reconnus par l'analyste lorsqu'ils surviennent.

➤ La sélectivité.

Ce critère est d'une importance particulière dans la définition des caractéristiques de performance des méthodes quantitatives utilisées dans les programmes de contrôle réglementaires (exemple du cas des contaminants environnementaux ou pesticides).

Elle définit la capacité de la méthode à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

Autrement, c'est la propriété d'une procédure d'analyse de convenir exclusivement à la caractéristique de l'analyte, avec la garantie que le résultat de l'analyse ne provient que de l'analyte cible. Exemple des techniques chromatographiques qui sont sélectives plutôt que spécifiques.

La sélectivité est primordiale dans le cas de méthodes d'identification ou de confirmation; en effet, dans le cas d'une expertise par exemple, le laboratoire doit fournir la preuve que la méthode d'analyse est suffisamment sélective pour une identification sans ambiguïté de l'analyte recherché.

En général, la spectrométrie de masse couplée à une méthode de séparation chromatographique est une combinaison très puissante pour répondre à ce critère de performance. Cette méthode fournit de nombreux paramètres mesurables comme le temps de rétention, la forme des pics chromatographiques, l'intensité ionique, l'abondance/ratio relatif, exactitude des masses et autres aspects utiles contribuant à l'identification de l'analyte et même sa structure.

➤ **La linéarité.**

Elle est évaluée dans un intervalle de concentrations appropriées (entre une valeur minimum et maximum) autour de la mesure escomptée et elle est obtenue en utilisant des standards. Elle permet de déterminer s'il y a linéarité entre la réponse de la mesure ou signal analytique et la concentration de la substance à analyser. Les résultats sont évalués au moyen de méthodes statistiques appropriées, comme la régression des moindres carrés. Il faut déterminer le coefficient de corrélation, le point d'interception sur l'axe des ordonnées (y), la pente de la courbe de régression.

Dans certains cas, pour mettre en évidence la linéarité entre les résultats de teneur et les concentrations, il faut soumettre les données à une transformation mathématique avant de faire l'analyse de régression et dans d'autres, comme les tests immunologiques, aucune forme de linéarité n'est présente quelle que soit la transformation qu'on fait subir aux données.

Lorsque c'est le cas, les résultats sont représentés par la fonction appropriée de la concentration (quantité) de la substance à analyser dans l'échantillon [85].

➤ **Limite de linéarité (LL).**

Elle est définie par le plus haut niveau fiable de mesure qu'on puisse utiliser en tenant compte de tous les facteurs à considérer dans une méthode.

L'étendue de concentration des étalons qui se situe entre la limite de quantification et la limite de linéarité est la zone quantifiable utilisée dans une méthode d'analyse. Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,995.

➤ **Justesse ou exactitude.**

C'est l'expression de la proximité des résultats obtenus avec la valeur réelle ; obtenue à l'aide d'un dopage de standard dans une matrice non contaminée à une concentration connue. Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur trouvée (moyenne) et la valeur acceptée comme référence (vraie) (Figure 4.1).

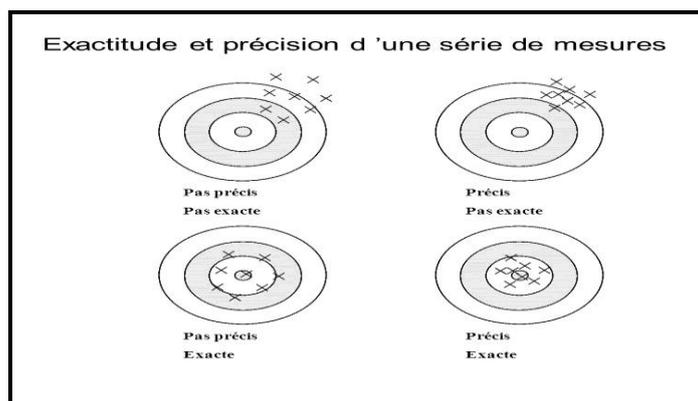


Figure 4.1 : Différence entre précision et exactitude

➤ **La précision ou fidélité.**

C'est l'expression de la proximité des résultats obtenus entre eux, déterminée par des répliques d'analyses et de manipulations. C'est une indication sur les erreurs liées au hasard et elle est généralement exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation (CV).

La précision peut s'évaluer à trois niveaux : Répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité.

- **Répétabilité.** Elle exprime la précision de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions après un court intervalle de temps « précision intra-analyse ».
- **Précision intermédiaire.** Elle correspond aux variations survenant dans un même laboratoire, analyses effectuées à des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc.
- **Reproductibilité.** C'est la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie).

➤ **Robustesse (solidité).**

C'est la capacité d'une méthode à ne pas être affectée pas de petits changements des paramètres expérimentaux; elle mesure sa capacité à supporter sans conséquence de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode et donne une idée de la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. Exemples de facteurs, la concentration de l'analyte, la méthode répliquée sur différents jours, différents manipulateurs, petit changement d'instrument ou de marque de réactif et sa concentration, le pH de la solution, la température, la durée de la manipulation et/ou d'autres facteurs pertinents.

Si les résultats peuvent varier selon les conditions d'analyse, il faut veiller à ce que celles-ci soient adéquatement contrôlées ou recommander certaines précautions dans la marche à suivre.

➤ **Limite de détection d'une méthode (LDM).**

C'est la plus faible concentration ou masse de composé analysé dans une matrice réelle qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode complète, incluant les extractions chimiques et le prétraitement, produit un signal détectable avec une fiabilité définie statistiquement différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions.

Il s'agit du niveau de dopage le plus faible dont la certitude est démontrée avec un niveau de confiance à 95 pour cent; il s'agit généralement de la concentration correspondante à un rapport signal/bruit de 3:1 dans la matrice appropriée ou bien à la concentration équivalente à 3 fois l'écart type d'un étalon à bas niveau dans un solvant approprié.

D'autres méthodes pour la détermination de la limite de détection sont proposées tenant en compte de la limite instrumentale de détection et aussi de l'effet des contaminations externes (blanc).

➤ **Limite de dosage ou de quantification d'une méthode d'analyse (LQM).**

Elle correspond à la plus faible quantité de substance analysée que la méthode permet de doser avec une fiabilité définie. La limite de dosage est un paramètre des analyses quantitatives des composés présents en faibles quantités dans les matrices d'échantillon; elle est plus particulièrement utilisée dans le dosage des impuretés et (ou) des produits de dégradation. Elle est estimée généralement par la concentration équivalente à un rapport signal/bruit de 10.

➤ **Taux de récupération.**

La récupération fait référence à la proportion de l'analyte récupérée et déterminée dans le résultat final, par rapport à la quantité ajoutée (en général par dopage d'un blanc d'échantillon) avant l'extraction, exprimée en tant que pourcentage. La nature et les quantités peuvent varier en fonction de la matrice, la méthode et des analytes recherchés. Pour des concentrations relativement élevées, les récupérations analytiques devraient approcher du 100% mais dans le cas de concentrations très faibles, particulièrement avec des méthodes impliquant des phases d'extraction, isolation et concentration extensives, les récupérations peuvent être inférieures.

Quelle que soit la moyenne des récupérations observées, une récupération avec une faible variabilité est souhaitable afin qu'une correction de récupération fiable puisse être effectuée dans le résultat final si nécessaire.

D'autres paramètres peuvent être évalués comme l'essai d'aptitude, la vérification de la compétence du système (cohérence entre le système équipement, opérations, échantillons...) par une estimation des incertitudes de mesures calculée à partir d'équations ou de modèles mathématiques et ceci à des fins recherchées entre le laboratoire et le client ou l'utilisateur final des données.

5 MISE AU POINT DE MÉTHODES D'ANALYSE DES ADDITIFS DE MATIÈRES PLASTIQUES A USAGE PHARMACEUTIQUE (CAS DU PLASTIFIANT DEHP DANS LE PVC À USAGE PARENTÉRAL).

Introduction :

Le conditionnement pharmaceutique doit avoir une qualité requise pour lui permettre de protéger la forme pharmaceutique tout au long de sa durée d'utilisation. L'autorisation de mise sur le marché d'un médicament n'est délivrée que si les contrôles réalisés sur le matériau sont conformes aux exigences de la pharmacopée et que les essais de stabilité de la forme pharmaceutique dans son conditionnement primaire sont satisfaisants.

Pour l'industriel pharmaceutique, il est facile de se prononcer sur la qualité de sa forme pharmaceutique par des analyses réalisées conformément aux documents de référence (pharmacopée ou dossier technique) mais l'évaluation des phénomènes de relargage éventuels des additifs à partir du conditionnement nécessite des investigations plus importantes.

Il serait intéressant de s'investir dans des contrôles plus approfondis sur la qualité des matériaux utilisés dans le conditionnement (par des mises au point de méthodes pour l'identification et le dosage des additifs et la recherche d'impuretés comme les monomères, les métaux...).

Les monographies de la pharmacopée offrent des méthodes analytiques très importantes mais, dans certains cas, elles nécessitent de grandes quantités de réactifs, une longue durée de réalisation et fournissent des informations plutôt globales que spécifiques comme dans le cas des relargables (organiques ou métalliques).

L'objectif de cette étude est de proposer des procédés d'extraction efficaces et des méthodes d'analyse fiables des additifs de matériaux plastiques à usage pharmaceutique en vue d'une utilisation principalement dans les contrôles de routine mais pouvant servir aussi à l'évaluation des phénomènes de relargage éventuels.

Le cas du PVC plastifié au DEHP a suscité un intérêt particulier du fait qu'il continue à être utilisé pour la fabrication de dispositifs médicaux malgré les contraintes réglementaires.

5.1 Matériels et méthodes.

Les matières premières, les échantillons utilisés ainsi que les réactifs sont résumés dans le Tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Matières premières, échantillons et réactifs utilisés.

Produit	Fournisseur
Poly (chlorure de vinyle) PVC de formule chimique (CH ₂ -CHCl) n de marque SHINTECH : SE 950 sous forme de résine blanche.	TRANSPOLYMERES
Phtalate de di-(2-éthylhexyle) (DEHP) de formule chimique C ₂₄ H ₃₈ O ₄	LG CHEMICAL
PVC plastifié au DEHP RB5 (granulé)	Modenplast
PVC plastifié au DEHP RB3 (granulé)	
PVC plastifié au DEHP RB5 (granulé)	Cabopol
PVC plastifié au DEHP RB3 (granulé)	
PVC plastifié sans phtalates RB5 (granulé)	Résilial
PVC plastifié sans phtalates RB3 (granulé)	
PVC plastifié sans phtalates RB5 (granulé)	Cabopol
PVC plastifié sans phtalates RB3 (granulé)	
Poches en PVC plastifié (remplies de sérum)	Entreprise IMC (Rouiba)
Ethanol 96% (CH ₃ -CH ₂ -OH)	PROLABO
Tétrahydrofurane (THF), C ₄ H ₈ O	MERCK
Dichlorométhane (CH ₂ Cl ₂)	PANREAC
Diéthyl éther (C ₄ H ₁₀ O)	BIOCHEM
Hexane (C ₆ H ₁₄)	PROLABO
Méthanol (CH ₃ OH)	PROLABO

La monographie de la pharmacopée européenne décrit le protocole à suivre pour le contrôle de la qualité du PVC plastifié à usage parentéral et pour l'identification et le dosage du DEHP mais le protocole proposé est long et nécessite l'utilisation de grands volumes de solvants. Aussi, les méthodes de quantification sont passées d'une méthode gravimétrique (non précise) à une méthode GC-MS non disponible dans tous les sites de production pharmaceutique [25, 86]. Ainsi, des méthodes d'analyse du plastifiant DEHP plus simples sont proposées dans ce travail à des fins de contrôles de routine.

5.1.1 Mise au point et validation de méthodes d'analyse du DEHP dans le PVC plastifié.

a. Analyse du DEHP par spectrophotométrie dans l'Ultra-violet UV.

L'analyse du DEHP est réalisée par un spectromètre UV-visible SHIMADZU UV-1700. Le balayage d'une solution de référence de DEHP dans l'éthanol entre 200 et 400 nm a permis de déterminer la longueur d'onde maximale λ_{max} .

b. Validation de la méthode par spectrométrie UV pour l'analyse du DEHP.

Le contrôle qualité n'est sûr que si les méthodes d'analyse utilisées sont fiables; celles-ci doivent être validées selon des critères spécifiques pour donner confiance aux résultats obtenus [76].

La souplesse du matériel médical comme les tubulures et poches nécessitent un taux de plastifiant important dans le PVC; il peut atteindre les 40% (m/m) dans la composition de ce dernier selon les exigences de la pharmacopée [25,86]. Les paramètres de validation évalués sont la linéarité, la précision et la spécificité.

- **Linéarité de la méthode.**

La linéarité de la méthode UV est vérifiée dans une gamme d'étalonnage de DEHP de (0,005 à 0,050) mg/mL dans l'éthanol. Les absorbances sont mesurées à λ_{max} spécifique au DEHP.

- **Précision de la méthode.**

Celle-ci est vérifiée par deux paramètres à savoir, la répétabilité et la reproductibilité. Pour le test de répétabilité, 10 solutions d'une même concentration standard de DEHP sont préparées et analysées par spectrométrie UV alors que pour la reproductibilité, la même concentration de DEHP est préparée par 5 opérateurs et analysée sur cinq jours successifs par la même méthode.

- **Spécificité de la méthode.**

Le PVC plastifié contient majoritairement du DEHP (env. 40%) mais l'adjonction d'autres additifs est autorisée par la pharmacopée comme l'octanoate de zinc, le stéarate de calcium, le N,N'-diacyléthylènediamine et les huiles époxydées (Soja, Lin..) [25].

L'évaluation de la spécificité de la méthode est importante car elle permet de vérifier que les adjuvants ou impuretés présents dans le PVC plastifié n'interfèrent pas avec l'analyse du DEHP.

Ce paramètre est vérifié lors des extractions du DEHP à partir du PVC plastifié (chapitre 5.1.2) sur une matrice en PVC sans plastifiant (blanc ou placebo).

c. Analyse du DEHP par chromatographie liquide à haute performance HPLC.

La chromatographie liquide HPLC est proposée comme une méthode alternative à la spectrométrie UV dans le cas de présence éventuelle d'additifs dans le PVC plastifié pouvant altérer l'analyse du DEHP (méthode UV non spécifique).

Plusieurs protocoles sont proposés en littérature pour l'analyse du DEHP ou des phtalates, en mode single ou en gradient avec différentes phases mobiles et longueurs d'ondes [90-94] mais dans cette étude, la méthode HPLC proposée est simple et les conditions chromatographiques sont citées ci-dessous. Une solution standard de DEHP est injectée afin de déterminer son temps de rétention Tr.

- Chromatographe : type Waters Symmetry, équipé d'une pompe et d'un détecteur UV-visible à 276nm,
- Colonne RP C18 (5µm) de 20cm de longueur,
- Phase mobile constituée de méthanol pur,
- Débit de la pompe de 0.8 ml/min,
- Volume injecté de 20µl.

d. Validation de la méthode HPLC pour l'analyse du DEHP.

La fiabilité de la méthode HPLC pour l'analyse du DEHP a été vérifiée par les mêmes paramètres de validation cités dans la méthode spectrométrie UV.

e. Analyse du DEHP par spectrométrie dans l'infra rouge à transformée de Fourier (FTIR).

La méthode infra rouge est parmi les méthodes les plus utilisées pour l'identification des matières premières pharmaceutiques et des articles de conditionnement plastiques [25, 86, 95]. Elle a aussi été exploitée pour évaluer les phénomènes de migration des additifs de matières plastiques [27, 96-98].

Dans cette étude, la méthode FTIR est exploitée essentiellement pour l'analyse qualitative du DEHP dans le PVC plastifié et l'évaluation de l'efficacité des procédés d'extraction de ce dernier à partir du matériau. Le FTIR utilisé est de type Jasco FTIR-4100 (4000 - 450) cm^{-1} muni du logiciel de traitement IR Solution. L'analyse est réalisée sur :

- des films en PVC vierge, afin de vérifier l'identité du polymère et sa pureté par rapport à un spectre de référence;
- des films en PVC plastifié, afin d'identifier les bandes spécifiques au DEHP;
- des films en PVC plastifié, avant et après extraction du DEHP afin d'évaluer l'efficacité des différents procédés d'extraction proposés dans cette étude, par le suivi de l'évolution des bandes spécifiques au DEHP.

5.1.2 Procédés d'extraction du DEHP à partir du PVC.

L'analyse des phtalates et en particulier le DEHP a fait l'objet de nombreuses études dans lesquelles des protocoles d'extraction très variés (SPE, LLE, Ultrasons..) sont proposées que ce soit, à partir du matériau plastique ou bien de solutions mises en contact avec des emballages plastiques [25, 86, 95, 99-106].

Dans cette étude, des procédés d'extraction du DEHP, inspirés de la littérature et optimisés sont appliqués sur des films en PVC plastifié, préparés au niveau du laboratoire (Figure 5.1).

a. Optimisation du procédé d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié.

Des films en PVC plastifié à 10%, 20%, 30% et 40% en DEHP et des films en PVC vierge (sans ajout de DEHP) sont préparés en solubilisant dans un bécher, une quantité de matière première de PVC (sous forme de poudre) dans du THF et en incorporant les quantités correspondantes de matière première de DEHP (sous forme huileuse); le PVC vierge est utilisé comme placebo (blanc) pour évaluer la spécificité des méthodes d'analyse. Le mélange est soumis à une agitation (env. 10min) afin de disperser le plastifiant d'une façon homogène dans le polymère.

A partir de la solution obtenue, des volumes sont prélevés à l'aide d'une éprouvette (10ml) et transvasés dans des boîtes de pétrie puis placées dans une étuve à 70°C. Après évaporation complète du solvant (au moins 6h à 70°C), les films sont détachés des boîtes de pétrie, découpés en petites pièces de 2x2 cm².

Les rendements d'extraction ou de récupération du DEHP à partir du matériau (films plastifiés à 30%) sont déterminés pour les différents procédés proposés afin d'évaluer leur efficacité.

Remarque : Pour les essais, seuls les films homogènes, de même épaisseur et de même masse sont utilisés.

- **Méthode d'extraction directe par chauffage à reflux.**

Cette méthode d'extraction directe est appliquée sur 0.5g de matériau. Les films sont découpés puis introduits dans un ballon à col rodé avec 50ml de solvant d'extraction.

Deux solvants favorables à la solubilisation du DEHP sont proposés à savoir l'hexane (apolaire) et l'éther di-éthylique (polaire). Le ballon est placé sur un réfrigérant et le tout est soumis à un chauffage à reflux pendant environ 8h.

L'extrait récupéré est évaporé à sec au rota-vapeur et le résidu obtenu est solubilisé dans 25 ml d'éthanol. Une dilution de 0.1ml dans 25ml d'éthanol est réalisée et la solution obtenue est analysée par spectrométrie UV et par HPLC.

Les films plastiques sont analysés par FTIR avant et après extraction.

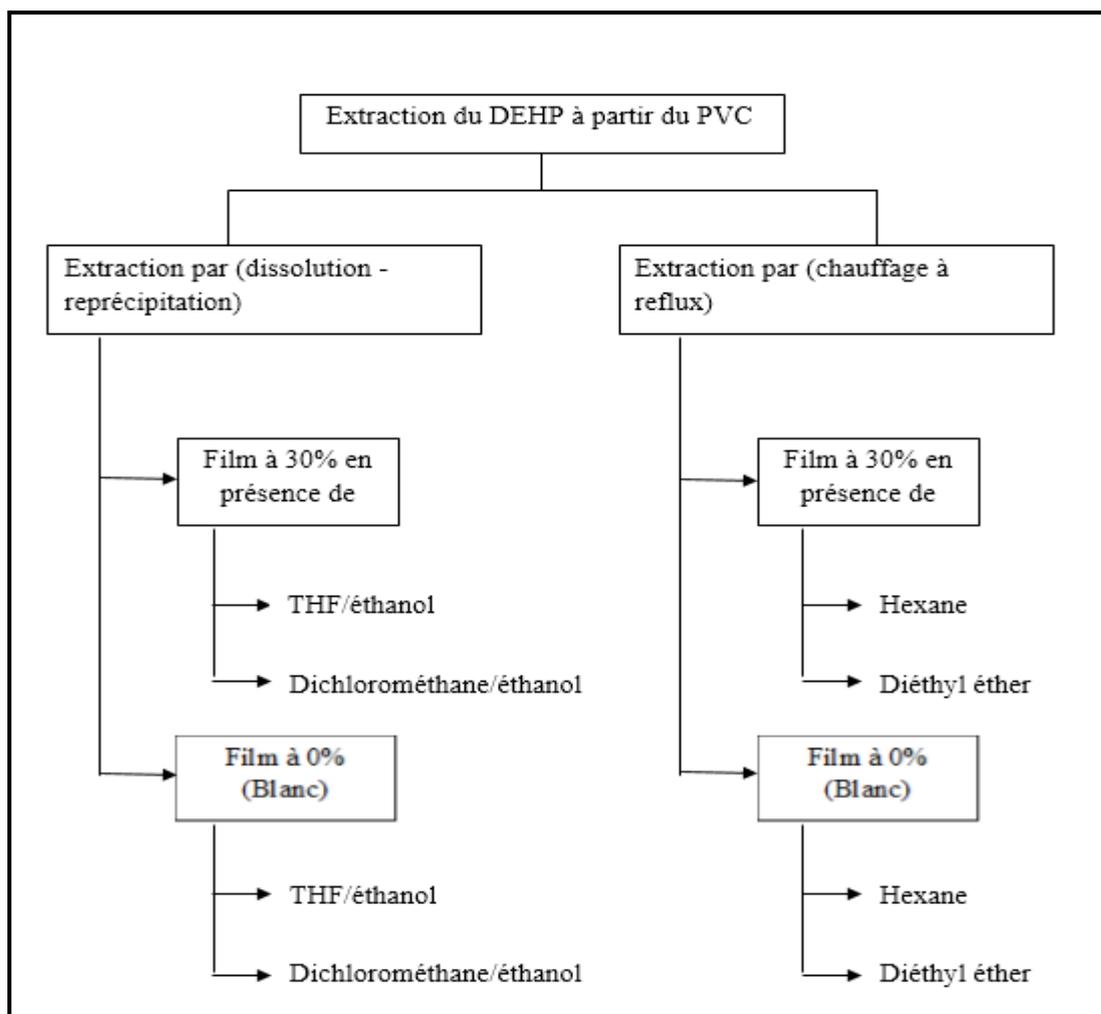


Figure 5.1 : Schéma du procédé d'extraction du DEHP.

- **Méthode indirecte par solubilisation-reprécipitation.**

Cette méthode est proposée par la Ph. Eu. pour l'identification du polymère en PVC mais nous l'avons exploitée pour l'analyse du DEHP.

0.5g de film sont découpés puis introduits dans un bécher de 250mL avec une quantité de 50mL de solvant; dans ce cas, ce sont des solvants favorables à la solubilisation du PVC qui sont sélectionnés à savoir, le THF et le dichlorométhane.

Après solubilisation complète du matériau, 100mL d'éthanol sont rajoutés à la solution afin de reprécipiter le polymère plastique. la reprécipitation du PVC peut se faire en utilisant d'autres solvants comme le méthanol, l'acétate d'éthyle mais l'éthanol a été choisi car c'est un solvant sans risque et très utilisé au niveau des industries pharmaceutiques. La masse blanche correspondant au plastique est récupérée par une filtration sous vide sur un millipore.

Le filtrat est évaporé à sec au rota-vapeur et le résidu est solubilisé dans 25mL d'éthanol. Une dilution de 0.1mL dans 25mL d'éthanol est réalisée et la solution obtenue est analysée par spectrométrie UV et par HPLC.

b. Evaluation de la spécificité des méthodes UV et HPLC pour l'analyse du DEHP.

Le paramètre de validation relatif à la spécificité des méthodes d'analyse est vérifié par l'application des différents protocoles d'extraction sur 0.5g de film en PVC non plastifié au DEHP (placebo ou blanc).

c. Evaluation de l'efficacité du procédé d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié.

La fiabilité du procédé d'extraction optimisé est évaluée par son application sur des films en PVC plastifié au DEHP à 10%, 20% et 40%, cette gamme étant sélectionnée sur la base des normes fixées par la Ph. Eu. (< 40%); trois essais sont réalisés pour chaque cas afin d'apprécier la répétabilité du procédé d'extraction.

5.1.3 Application de la méthodologie à l'analyse du DEHP dans des poches pour perfusion et des matières premières (granulé) en PVC plastifié.

L'application du procédé d'extraction optimisé et des méthodes d'analyse validées est réalisée sur des poches en PVC pour perfusion remplies de sérum et sur des matières premières MP (sous forme de granulé) utilisées dans la fabrication de dispositifs médicaux (DM).

Deux lots de MP sont analysés, du PVC plastifié au DEHP et du PVC sans phtalates (Tableau 5.1) afin de vérifier leur conformité par rapport à la réglementation et au dossier du fournisseur. En effet, le DEHP est interdit par la CE n°1272/2008 dans les dispositifs médicaux DM destinées aux services de pédiatrie, de néonatalogie et de maternité [24].

Les substituts au DEHP ne sont pas encore décrits dans les pharmacopées et les fournisseurs ne donnent aucune indication sur leur identité mais déclarent juste l'absence de phtalates.

L'essai est réalisé sur 0,5g de matériau (granulé et film récupéré à partir de la poche après élimination de la solution pour perfusion). L'analyse des extraits obtenus par spectrométrie UV et par HPLC par rapport à une solution standard de DEHP à 0,02mg/mL dans l'éthanol a permis d'évaluer la teneur de DEHP dans les différents échantillons analysés.

Remarque : Le PVC RB3 est utilisé pour la fabrication de la tubulure épaisse et le PVC RB5 est utilisé pour la fabrication des autres parties de la tubulure comme le montre la Figure 5.2.

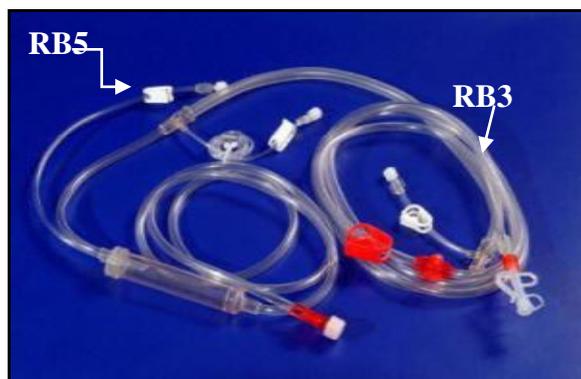


Figure 5.2 : Ligne de sang pour hémodialyse

5.1.4 Tentative d'identification du plastifiant alternatif au DEHP par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse GC-MS.

La GC-MS offre de meilleures performances pour identifier des composés grâce à leur schéma de fragmentation (spectre de masse); elle a été utilisée pour l'analyse des phtalates dans différents domaines pharmaceutique, agroalimentaire et environnemental [5, 107-109]. Du fait de sa grande sensibilité, elle a été exploitée pour vérifier l'absence du DEHP dans les matières premières en PVC déclarées sans phtalates par le fournisseur [24, 110].

Nous avons utilisé un chromatographe type Hewlett Packard Agilent 6890 plus, équipé d'un spectromètre de masse Hewlett Packard Agilent 5973 dans les conditions chromatographiques citées dans le Tableau 5.2 [102].

L'application de la méthode a été réalisée sur les deux lots de MP en PVC plastifié sans phtalates. Aussi, une tentative d'identification du substitut ou alternatif du DEHP est réalisée grâce à une comparaison du spectre de masse obtenu et ceux de la librairie (base de données).

Tableau 5.2: Conditions chromatographiques pour l'analyse des plastifiants par GC-MS

Injecteur	Température : 250°C Mode d'injection : Splittess Volume injecté : 01 µl
Colonne	Type : HP-5MS Dimensions: (30m x 0,25mm x 0,25 µm) Phase stationnaire: 5% Phényle 95% dimethylpolysiloxane.
Température du four	40°C pendant 5 min, 10°C/min jusqu'à 280°C, isotherme pendant 21 min. Durée d'analyse : 50 min Gaz vecteur : Hélium pur Débit du gaz vecteur : 1 mL/min
Détecteur de masse	Mode d'analyse : Scan TIC (de 30 à 550). Délai du solvant : 3.5 min. Température de l'interface : 270°C Type d'ionisation : Impact électronique. Intensité du filament : 70 eV. Type de l'analyseur de masse : Quadripôles Température de la source : 230°C

5.2 Résultats et discussion.

5.2.1 Validation des méthodes d'analyse du DEHP par spectrométrie UV et par chromatographie HPLC.

L'analyse de la solution standard de DEHP à 0,02 mg/mL dans l'éthanol par spectrométrie UV et par HPLC a donné respectivement, le spectre et le chromatogramme représentés dans la Figure 5.3.

L'analyse du DEHP par UV montre un spectre avec deux bandes d'absorption aux longueurs d'ondes $\lambda_{\text{max}} = 225\text{nm}$ et $\lambda_{\text{max}} = 276\text{nm}$ et un pic bien résolu au temps de rétention $T_r = 4\text{min.}$ par HPLC.

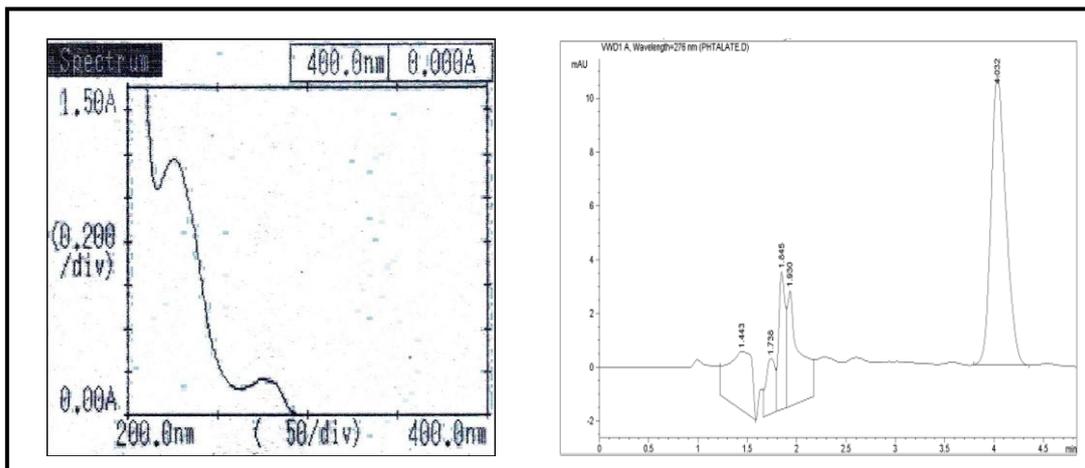


Figure 5.3 : Spectre UV et chromatogramme du DEHP

- **Linéarité de la méthode.**

Les résultats des absorbances et des surfaces obtenus respectivement par UV et HPLC dans l'étude de la linéarité des méthodes d'analyse sont résumés dans l'Appendice C (Tableau C.1) et représentés par la Figure 5.4.

Les coefficients de régression > 0.99 traduisent la bonne linéarité des réponses des deux méthodes d'analyse proposées.

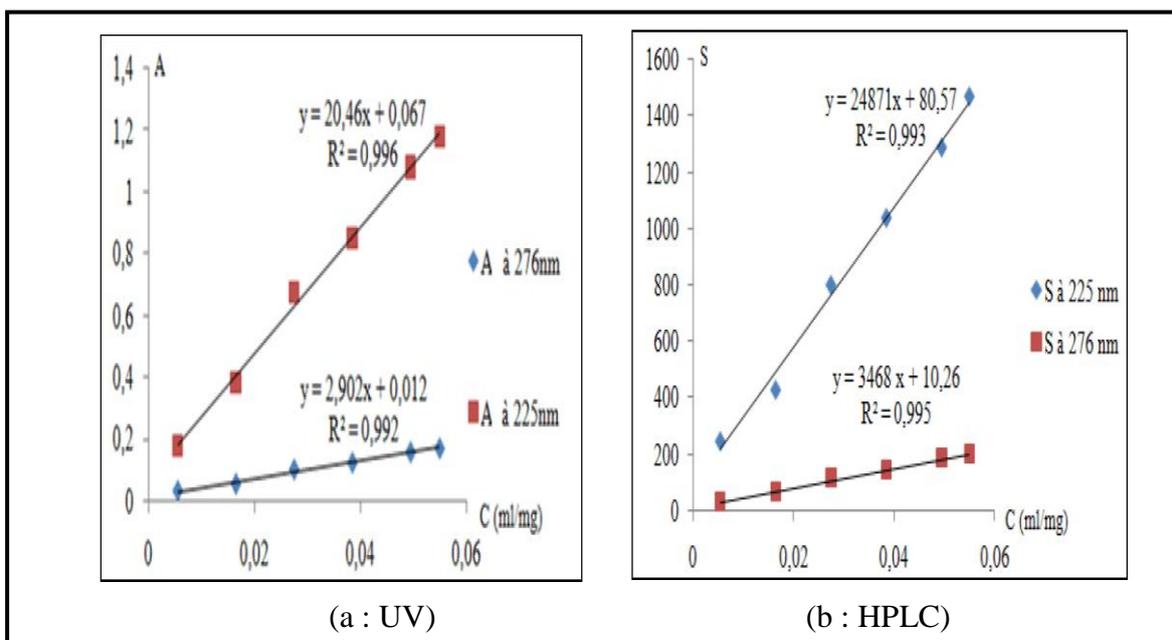


Figure 5.4 : Linéarité des méthodes UV (a) et HPLC (b) pour l'analyse du DEHP

- **Précision des méthodes UV et HPLC pour l'analyse du DEHP.**

Les résultats des paramètres de répétabilité et de reproductibilité des deux méthodes d'analyse du DEHP par spectrométrie UV et HPLC sont résumés dans le Tableau 5.5.

Tableau 5.3 : Précision des méthodes UV et HPLC pour l'analyse du DEHP

UV				HPLC			
Répétabilité		Reproductibilité		Répétabilité		Reproductibilité	
Echantillons	Abs	Echantillons	Abs	Echantillons	Aire	Echantillons	Aire
1	0,093	1	0,093	1	103,54	1	104,25
2	0,092			2	100,70		
3	0,093	2	0,096	3	107,93	2	106,01
4	0,091			4	104,13		
5	0,096	3	0,095	5	101,22	3	112,57
6	0,095			6	100,26		
7	0,095	4	0,089	7	101,96	4	110,68
8	0,097			8	102,26		
9	0,096	5	0,097	9	106,01	5	106,43
10	0,095			10	102,26		
Moyenne	0,094	Moyenne	0,094	Moyenne	103,03	Moyenne	107,99
CV %	2,06	CV %	3,36	CV %	2,35	CV %	3,22

Les faibles valeurs des coefficients de variation obtenues pour la répétabilité et la reproductibilité avec les deux méthodes d'analyse reflètent la bonne précision de ces dernières.

5.2.2 Analyse du DEHP par spectrométrie FTIR.

L'analyse des films en PVC vierge (blanc) et en PVC plastifié à 30% a donné les spectres représentés par la Figure 5.5. Celle-ci a permis de ressortir trois bandes spécifiques au DEHP, qui ne sont pas altérées par celles du PVC et dont les nombres d'ondes se situent aux environs de 1720 cm^{-1} (bande très intense correspondant au carbonyle C=O) et $(1600, 1580)\text{ cm}^{-1}$ (correspondant à C=C du phényle) qui sont citées en littérature [95, 97].

Aussi, l'analyse des films en PVC plastifié à 10%, 20%, 30% et 40% a permis de voir une évolution claire de l'intensité des deux bandes à 1600 cm^{-1} et 1580 cm^{-1} en fonction de la concentration du DEHP (Figure 5.6).

Ce doublet a aussi été mentionné dans Test Method: CPSC-CH-C1001-09.3 [102] pour la détermination des phtalates dans les matières plastiques et il est retenu dans cette étude pour évaluer l'efficacité des procédés d'extraction proposés.

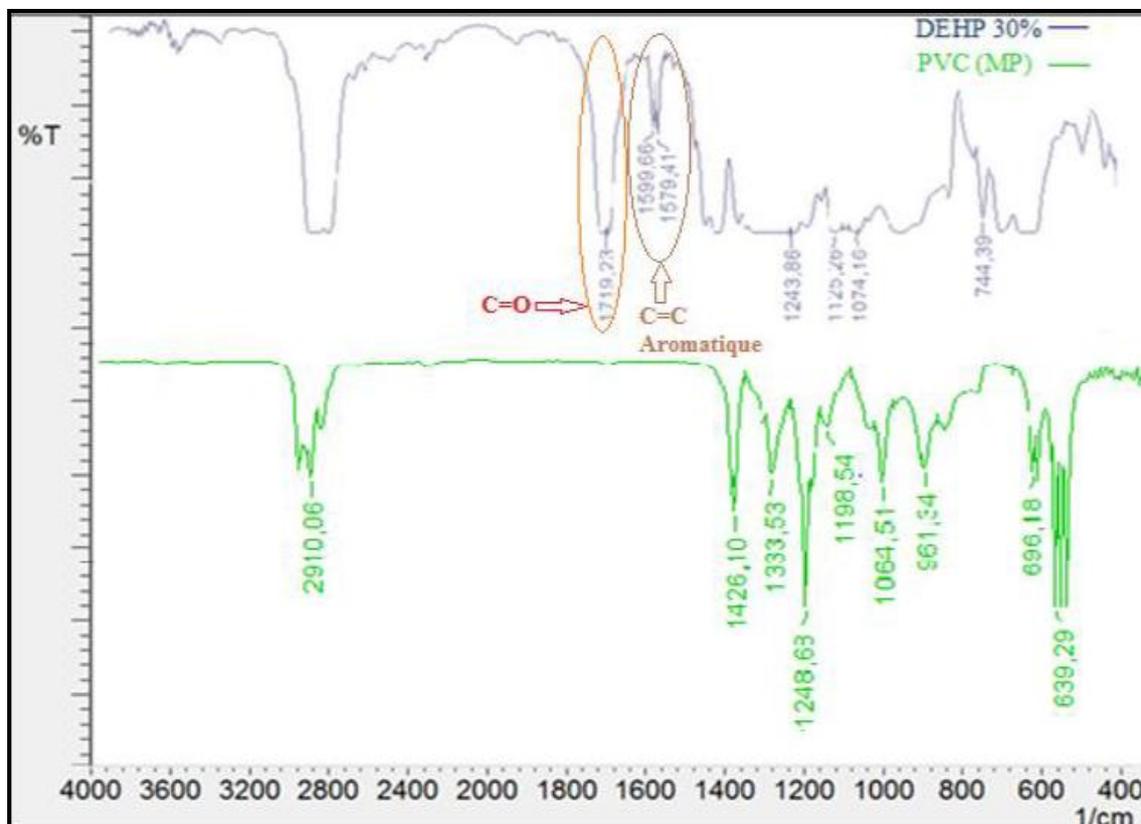


Figure 5.5 : Spectre FTIR des films en PVC et PVC plastifié au DEHP à 30%.

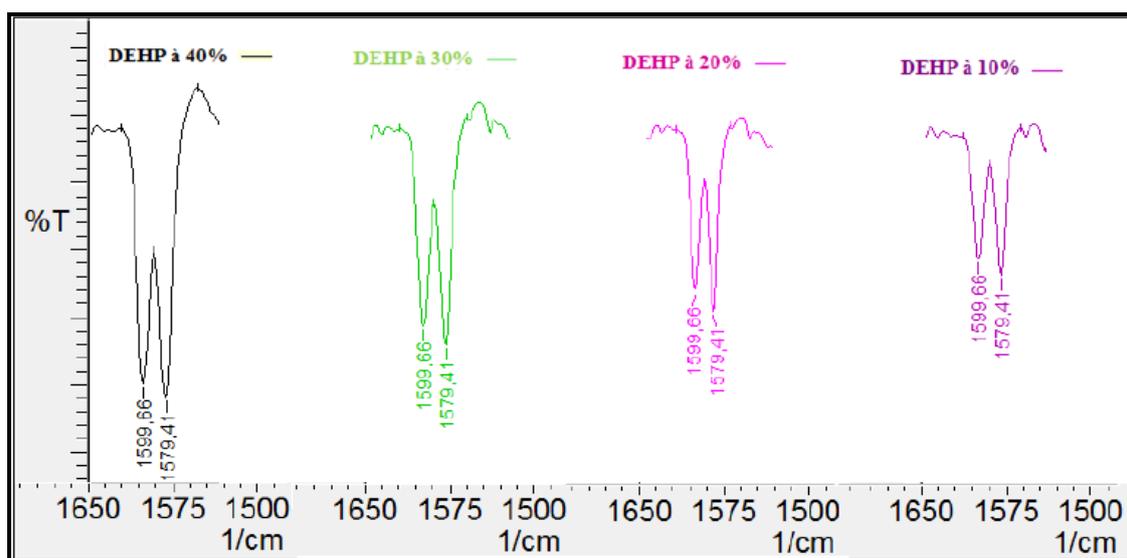


Figure 5.6: Evolution des bandes à 1600 cm^{-1} et 1580 cm^{-1} en fonction de la concentration du DEHP.

5.2.3 Evaluation de l'efficacité des procédés d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié.

Les solutions obtenues après extraction du DEHP à partir de films en PVC plastifié à 30%, par les différents procédés sont analysés par spectrométrie UV et par HPLC et les films plastiques utilisés sont analysés avant et après extraction par FTIR.

L'extraction effectuée sur des films en PVC (vierge ou sans ajout de DEHP) a permis d'évaluer la spécificité des méthodes d'analyse proposées.

Spécificité des méthodes UV et HPLC.

Le spectre et le chromatogramme des extraits obtenus avec le PVC vierge (placebo ou Blanc) sont représentés par la Figure 5.7.

Le spectre de l'extrait obtenu avec le film sans DEHP ne présente aucune absorbance aux longueurs d'onde spécifiques au DEHP (soient 276nm et 225nm) et le chromatogramme correspondant au même extrait ne présente aucun pic au temps de rétention du DEHP (env. 4min.) ce qui permet de déduire que les deux méthodes proposées sont spécifiques à l'analyse du DEHP dans le PVC plastifié.

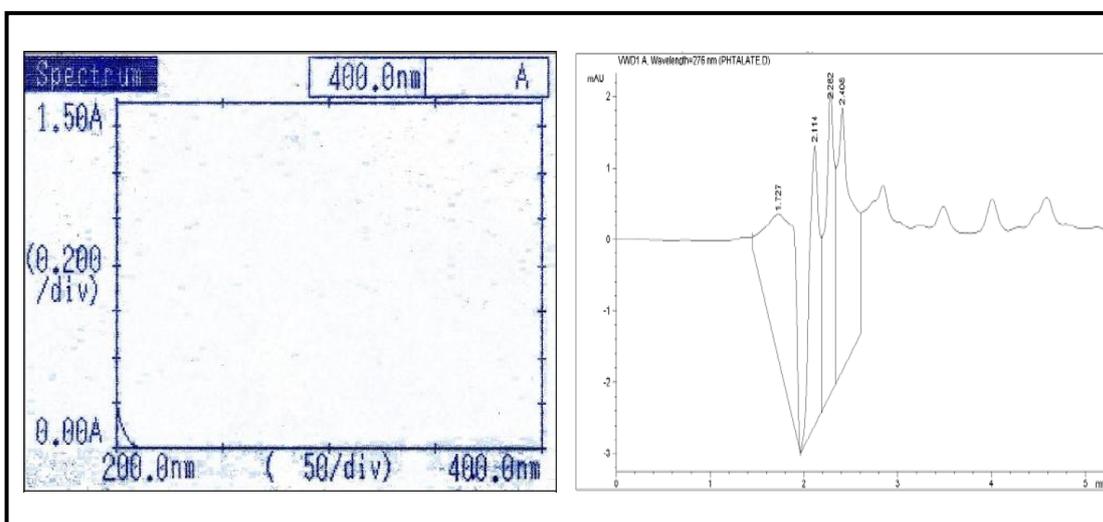


Figure 5.7 : Spécificité des méthodes UV et HPLC pour l'analyse du DEHP.

Conclusion sur la fiabilité des méthodes d'analyse.

Les paramètres de validation traités dans cette étude à savoir, la linéarité, la précision et la spécificité et appliqués aux deux méthodes UV et HPLC ont donné des résultats satisfaisants et les deux méthodes sont considérées fiables pour l'analyse du DEHP dans le PVC plastifié.

Quant à l'optimisation du procédé d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié, les résultats des rendements obtenus par les différents procédés d'extraction proposés sont reportés dans Tableau 5.4.

Les résultats montrent clairement que la méthode indirecte (par solubilisation-reprécipitation) donne de meilleurs résultats comparativement au procédé direct par chauffage à reflux. En effet, le DEHP n'est pas complètement libre dans la matrice polymérique, il est retenu dans le réseau par des forces ou des liaisons électrostatiques (type hydrogène) qui l'empêchent de sortir complètement même après un chauffage à reflux de 8h [111, 112].

Tableau 5.4 : Rendement d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié par les différents procédés proposés.

Solvant	Echantillon	Résultats par UV			Résultats par HPLC		
		Abs	R %	M ± CV (%)	Aire des pics	R%	M ± CV (%)
Méthode directe (Ether di-éthylique)	1	0,076	89,12	89,98 ± 1,13	80,563	81,93	83,89± 3,65
	2	0,077	89,72		81,542	82,33	
	3	0,078	91,10		85,951	87,43	
Méthode directe (Hexane)	1	0,073	84,25	82,58 ± 2,42	79,542	80,07	79,48± 2,34
	2	0,070	80,36		77,016	77,39	
	3	0,072	83,13		80,112	80,98	
Méthode indirecte (THF/Ethanol)	1	0,090	99,79	99,25±1,10	98,701	97,48	98,0± 0,53
	2	0,089	97,99		99,131	98,52	
	3	0,091	99,98		98,260	98,00	
Méthode indirecte (Dichlorométhane/éthanol)	1	0,082	96,39	96,13± 0,72	89,688	91,53	91,31± 0,85
	2	0,085	96,66		93,266	91,97	
	3	0,084	95,34		91,8921	90,45	

Par contre, dans le procédé indirect, le plastique en PVC est totalement solubilisé dans un solvant adéquat, ce qui permet une libération complète du DEHP. L'ajout de l'éthanol a permis de reprécipiter le polymère (masse blanche) qui est insoluble dans ce solvant mais pas le DEHP qui lui, est très soluble dans ce dernier.

Aussi dans le procédé indirecte par la méthode indirecte, les rendements sont meilleurs avec le THF car le PVC est plus facilement soluble dans ce dernier même à froid alors que dans le cas du dichlorométhane, un chauffage léger est nécessaire, ce qui justifie ces résultats.

Dans le cas de la méthode directe (chauffage à reflux), les rendements d'extraction du DEHP sont légèrement supérieurs dans le cas d'utilisation de l'éther diéthylique par rapport à l'hexane. En effet, le DEHP présente un caractère lipophile et il est soluble dans les deux solvants organiques mais son affinité plus importante pour l'éther diéthylique est attribuée à son caractère polaire par rapport à l'hexane qui est apolaire [107]. Ce solvant est aussi préconisé par la Ph. Eu. pour l'extraction des additifs du PVC plastifié [25, 86].

Les résultats obtenus par la méthode spectrométrie UV sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par HPLC; ceci est cohérent du fait que l'HPLC est une méthode de séparation et elle est plus sélective comparativement à la spectrométrie UV qui, elle nous renseigne sur une analyse globale des extraits (DEHP et autres résidus présents même à l'état de traces).

L'analyse par spectrométrie FTIR des films avant et après extraction avec les différents procédés a donné les spectres représentés par la Figure 5.8 (zoom sur les nombres d'ondes à 1650cm^{-1} et 1550cm^{-1}).

Une diminution significative des deux bandes caractéristiques au DEHP est observée dans le cas des extractions par reflux (méthode directe) alors qu'elles disparaissent dans le cas du procédé indirect (solubilisation-reprécipitation). Ce résultat confirme ceux obtenus avec les deux méthodes d'analyse UV et HPLC.

La fiabilité du procédé optimisé pour l'extraction du DEHP à partir du PVC est vérifiée sur des films plastifiés au DEHP à différentes concentrations. Les résultats des rendements d'extraction et des coefficients de variation sont résumés dans le Tableau 5.5.

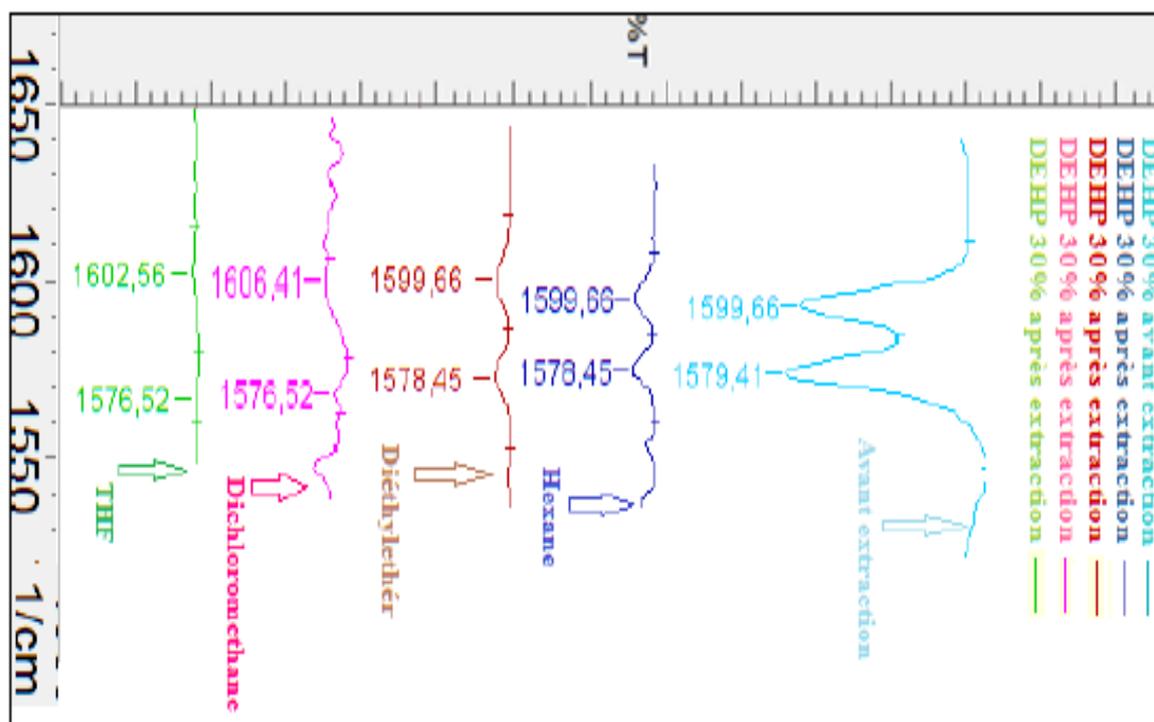


Figure 5.8 : Suivi de l'évolution des bandes à 1600 cm^{-1} et 1580 cm^{-1} du DEHP en fonction du procédé d'extraction.

Tableau 5.5 : Résultats de la fiabilité du procédé d'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié par la méthode indirecte.

% DEHP	Echantillon	Résultats par UV			Résultats par HPLC		
		Abs	R %	M \pm CV (%)	Aire des pics	R%	M \pm CV (%)
10%	1	0,039	98,02	98,64 \pm 0,55	31,299	96,32	96,56 \pm 0,71
	2	0,040	98,87		30,369	96,02	
	3	0,041	99,05		32,689	97,34	
20%	1	0,063	97,78	98,09 \pm 0,30	56,241	95,67	97,41 \pm 1,71
	2	0,064	98,38		59,159	97,55	
	3	0,065	98,12		63,437	99,01	
30%	1	0,090	99,79	99,25 \pm 1,10	98,701	97,48	98,0 \pm 0,53
	2	0,089	97,99		99,131	98,52	
	3	0,091	99,98		98,260	98,00	
40%	1	0,116	99,30	99,11 \pm 0,17	112,569	98,56	98,63 \pm 0,56
	2	0,118	98,98		117,851	99,23	
	3	0,119	99,05		111,041	98,12	

De bons rendements d'extraction du DEHP sont obtenus par la méthode optimale (méthode indirecte THF/éthanol) dépassant les 95% et ce, quelque soit la teneur du DEHP dans le PVC plastifié.

Ces résultats intéressants confirment la libération complète du DEHP à partir de la matrice polymérique en PVC. Des taux de récupération de 76% à 100% de DEHP à partir de matériaux plastiques ont été obtenus par une extraction aux ultra-sons par KATARZYNA JAWOREK et al. [104].

Aussi, les faibles coefficients de variations ($CV < 5\%$) observés démontrent la reproductibilité du procédé d'extraction proposé pour l'analyse du DEHP dans le PVC plastifié.

Conclusion.

A partir des résultats obtenus, la méthode d'extraction indirecte par solubilisation-reprécipitation (THF/ éthanol) est retenue comme méthode de choix pour l'extraction du DEHP à partir du PVC plastifié. D'une part, elle a permis d'obtenir le rendement d'extraction le plus élevé et d'autre part, sa mise en œuvre est facile et nécessite un temps de réalisation faible (à peine 1h).

Cette même méthode a été exploitée par l'ANSM pour évaluer la conformité des DM mis sur le marché par rapport à leur composition en DEHP [105].

5.2.4 Application de la méthodologie à l'analyse du DEHP dans les poches pour perfusion et les matières premières (granulé) en PVC plastifié.

a. Cas du PVC plastifié au DEHP.

Le protocole d'extraction et les méthodes d'analyse par UV et par HPLC proposés dans cette étude sont appliqués pour l'analyse de différents échantillons en PVC (poches remplies de solutions intraveineuses et matières premières (MP) sous forme de granulé de différents fournisseurs). Les résultats des analyses obtenus par UV et HPLC sont résumés dans le Tableau 5.6.

Selon les exigences de la Ph. Eu. en vigueur, le taux de DEHP dans le PVC plastifié ne doit pas dépasser les 40% (m/m), les résultats obtenus dans le granulé et dans la poche sont conformes avec les deux méthodes d'analyse.

Tableau 5.6 : Résultats de l'analyse du DEHP dans les poches et les MP (granulé) en PVC plastifié.

		Par la méthode UV (276nm)		Par la méthode HPLC (276nm)		
Echantillons		R %	M ± CV(%)	R%	M ± CV (%)	
Poche	1	32,14	32,04 ± 4,86	31,05	29,79 ± 4,21	
	2	33,55		29,78		
	3	30,44		28,54		
Grain Cabopol	RB5	1	33,60 ± 4,39	30,74	31,03 ± 3,35	
		2		35,09		30,17
		3		32,14		32,19
	RB3	1	28,26 ± 4,02	27,89	26,82 ± 4,31	
		2		26,98		25,59
		3		28,67		26,98
Grain Modenplast	RB5	1	37,48 ± 4,48	33,76	35,26 ± 4,34	
		2		39,28		36,82
		3		37,22		35,22
	RB3	1	29,83 ± 4,87	26,86	27,19 ± 4,41	
		2		31,18		28,52
		3		28,29		26,19

Il ressort aussi des résultats du tableau des taux de DEHP plus faibles dans les MP RB3 par rapport à RB5. En effet, ces deux matières premières sont destinées à la fabrication de parties différentes dans la ligne pour hémodialyse, le RB5 est utilisé dans la fabrication de la tubulure qui est plus souple et nécessite un taux de DEHP plus important.

Dans le cas de la poche, le taux de DEHP obtenu est comparable à ceux retrouvés par IVANA S. et al. (2016) lors des contrôles réalisés sur des poches pour perfusion et qui étaient compris entre 31% et 34% [106].

Conclusion.

La méthodologie proposée dans cette étude (extraction et analyse) a permis de vérifier la conformité du taux de DEHP contenu dans les MP (granulé) destinées à la fabrication de DM et les poches pour perfusion mises sur le marché. Elle peut être proposée pour un contrôle qualité de routine (protocole ou mode opératoire décrit en Appendice C).

b. Cas du PVC plastifié (sans phtalates).

Dans le cas de MP en PVC plastifié (sans phtalates), aucune information n'est donnée par le fournisseur quant à l'identité du plastifiant alternatif utilisé. En effet, pour assurer la sécurité des produits mis sur le marché, la gamme du nouveau matériau est en phase d'extension pour éliminer totalement celle du PVC plastifié au DEHP.

Une application de la méthodologie proposée dans cette étude a été réalisée sur ces MP à des fins comparatives complétée par une analyse par chromatographie sur couche mince CCM proposée par dans la Ph. Eu. pour l'analyse du DEHP dans le PVC plastifié à usage parentéral [25, 86]; l'objectif étant de s'assurer de l'absence du DEHP dans le nouveau matériau comme indiqué par le fournisseur.

- **Analyse des plastifiants par chromatographie sur couche mince (CCM).**

L'application du procédé d'extraction proposé aux différentes MP en PVC (avec DEHP et sans phtalates) et l'analyse des extraits obtenus par CCM a donné les résultats représentés par la Figure 5.9.

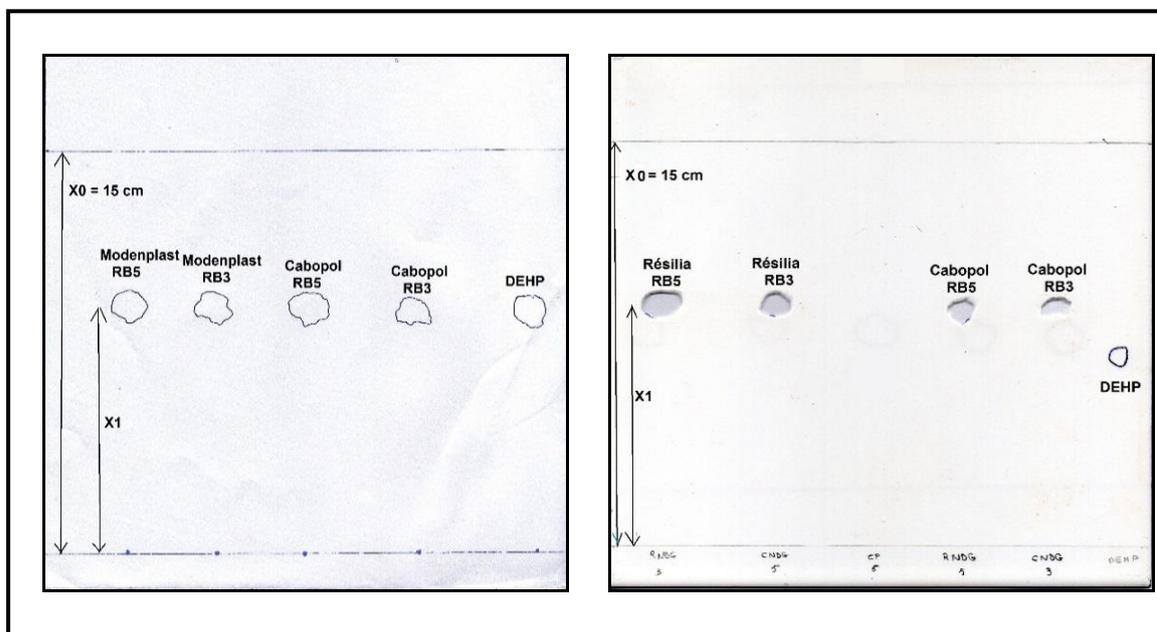


Figure 5.9 : Analyse par CCM du PVC plastifié (au DEHP et alternatif).

Les résultats montrent clairement la présence d'une seule tâche dont le rapport frontal est le même que celui du DEHP ($R_f = 0,62$) dans les matières premières en PVC plastifié au DEHP.

Dans le cas du nouveau matériau (sans phtalates), aucune tâche n'est observée au R_f du DEHP indiquant ainsi son absence mais, en l'occurrence, une autre tâche bien éluée apparaît et dont le R_f est de 0,74. Ces résultats intéressants permettent de déduire que le protocole proposé pour l'identification du DEHP peut être appliqué aussi au plastifiant alternatif.

- **Analyse des plastifiants par spectrométrie FTIR.**

A partir de MP sous forme de granulé en PVC plastifié (au DEHP et sans phtalates), des films sont préparés selon la procédure décrite précédemment et sont analysés par FTIR. Les spectres obtenus (avec un zoom sur la partie représentant les bandes spécifiques au DEHP) sont représentés par la Figure 5.10. Le spectre obtenu avec le PVC plastifié au DEHP est identique à celui de la référence (PVC plastifié au DEHP à 30%), ce qui démontre que les MP contrôlées sont bien plastifiées au DEHP.

Dans le cas du nouveau matériau, le spectre obtenu est différent (absence de la bande à 1600cm^{-1} et présence d'une bande aux environs de 1500cm^{-1}) traduisant ainsi l'absence du DEHP dans ce dernier.

- **Analyse des plastifiants par spectrométrie UV.**

Les extraits obtenus à partir des MP en PVC plastifiés (au DEHP et sans phtalates) sont analysés par spectrométrie UV. Le balayage des solutions obtenues a donné des spectres représentés par la Figure 5.11.

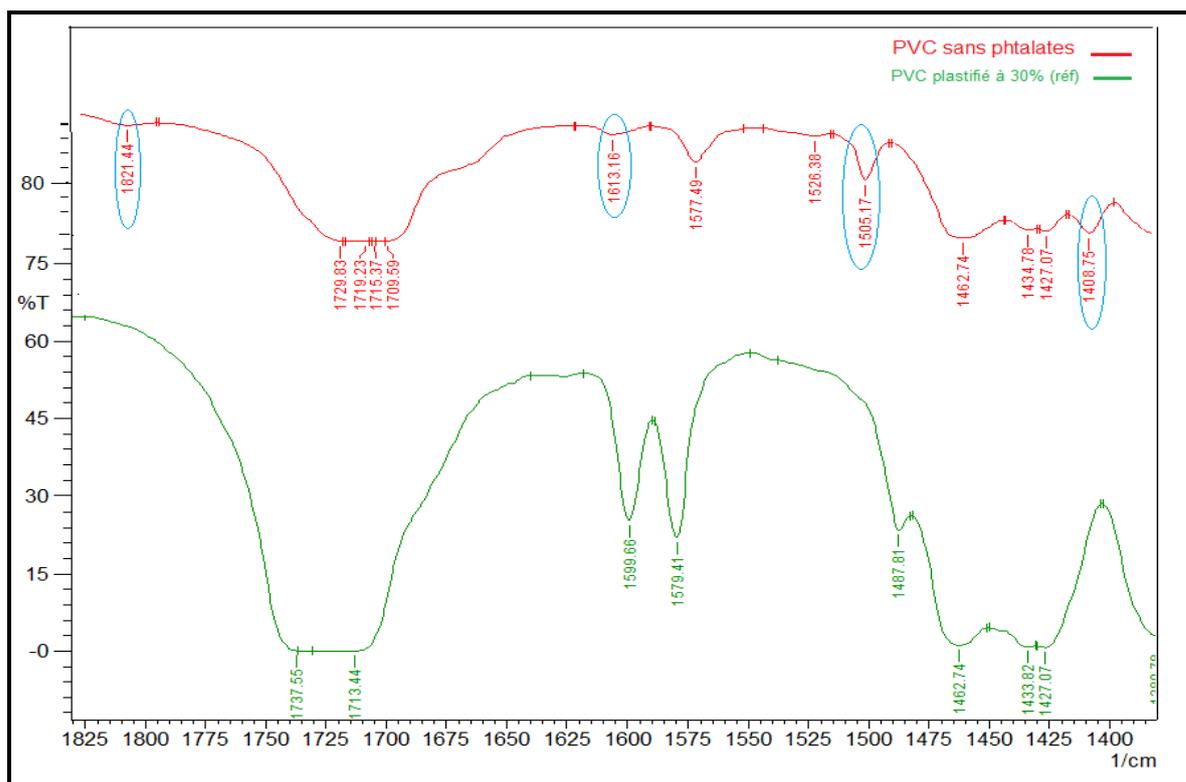


Figure 5.10 : Analyse par FTIR du PVC plastifié (au DEHP et alternatif).

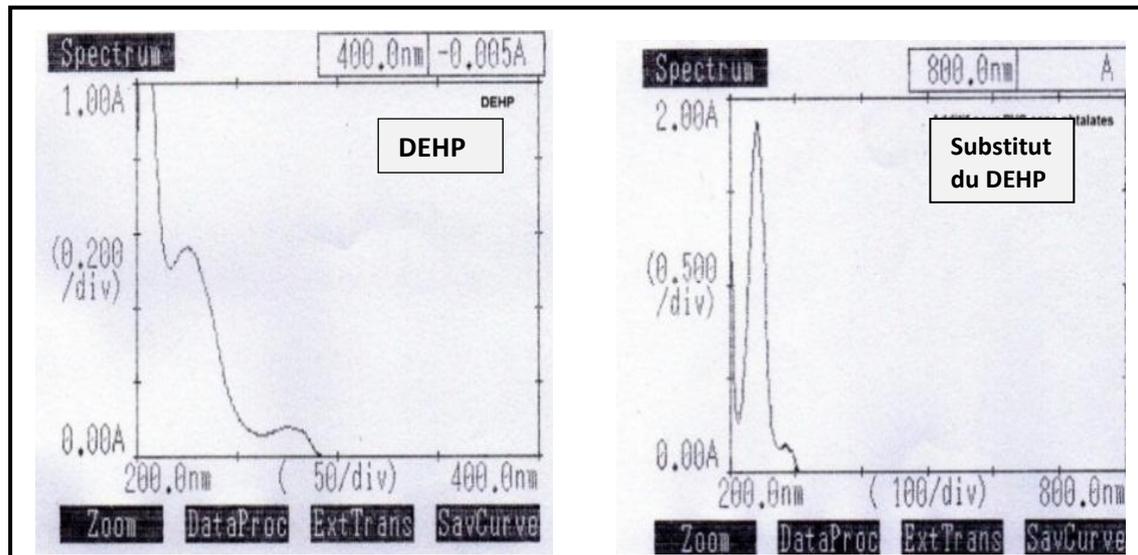


Figure 5.11 : Analyse par spectrométrie UV du PVC plastifié (au DEHP et alternatif).

Le spectre obtenu avec le PVC plastifié au DEHP est comparable à celui de la solution de référence (voir résultats partie validation de la méthode) avec deux bandes spécifiques à 276nm et 225nm ce qui confirme que ce matériau est bien plastifié au DEHP.

Par contre, dans le cas du nouveau matériau, l'allure du spectre est complètement différente et les maximums d'absorption sont observés vers 285nm et 242nm traduisant d'une part, l'absence du DEHP et d'autre part, la présence de chromophores dans le plastifiant alternatif qui absorbent dans le domaine de l'Ultra- violet et peut être ainsi analysé par cette méthode.

- **Analyse des plastifiants par chromatographie HPLC.**

Les mêmes extraits obtenus avec les MP en PVC plastifié (au DEHP et alternatif) sont analysés par HPLC; les chromatogrammes obtenus sont représentés par la Figure 5.12.

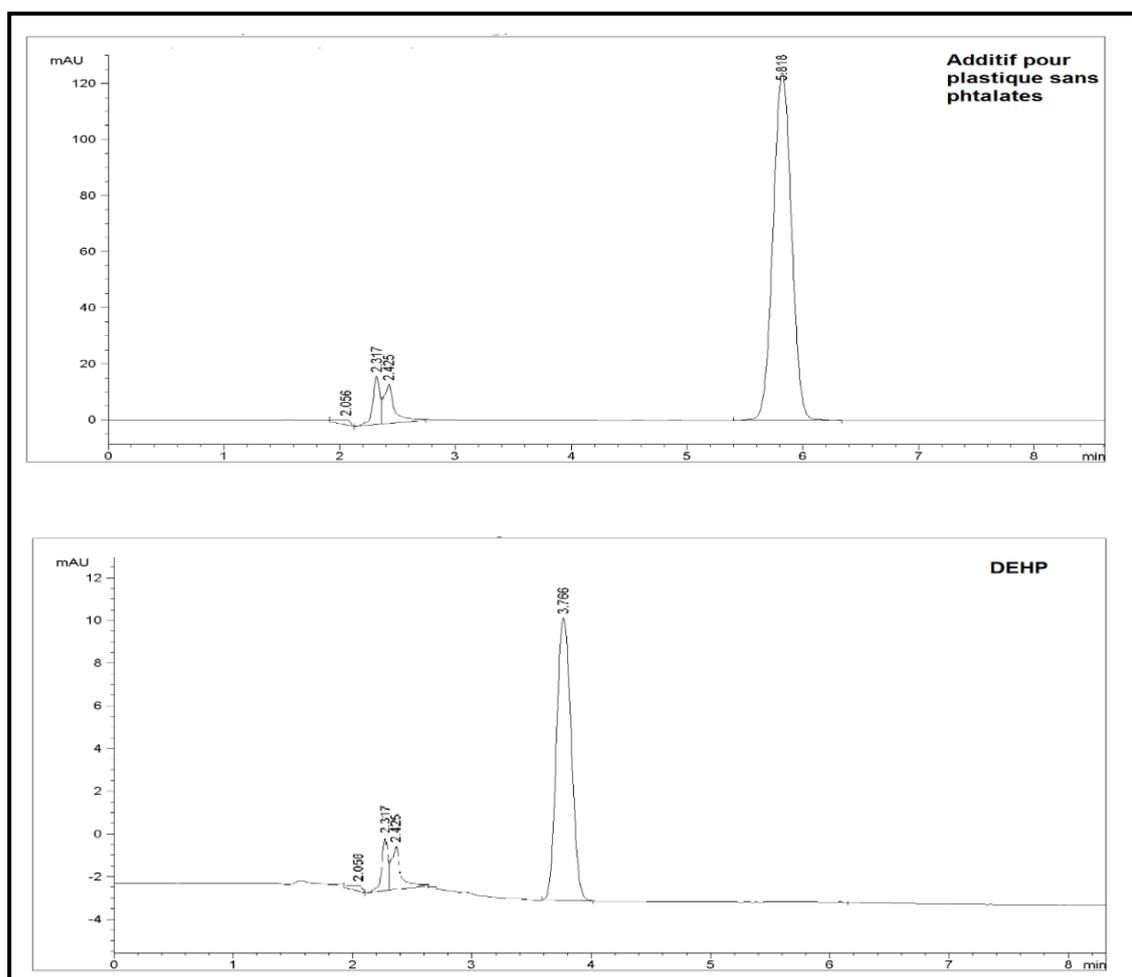


Figure 5.12 : Chromatogrammes des extraits obtenus avec le PVC plastifié (au DEHP et alternatif).

Le chromatogramme obtenu avec l'extrait du PVC plastifié au DEHP présente un pic avec un temps de rétention identique à celui du DEHP référence mais aucun pic n'apparaît à ce temps de rétention dans le cas du PVC (déclaré sans phtalates) ce qui confirme son absence.

En l'occurrence, le chromatogramme de l'extrait du PVC (sans phtalates) fait paraître un pic bien élué au temps de rétention $T_r = 6,82$ min suggérant ainsi la possibilité d'adapter cette même méthode pour l'analyse de ce plastifiant alternatif au DEHP dans le nouveau matériau en PVC.

Conclusion.

Les méthodes proposées dans cette étude ont permis d'analyser le DEHP dans les matériaux à base de PVC plastifié au DEHP et ont confirmé son absence dans le nouveau matériau en PVC destiné au service de maternité.

Les résultats de cette étude permettent aussi de déduire que ces mêmes méthodes peuvent être adaptées au plastifiant utilisé comme alternatif du DEHP.

5.2.5 Tentative d'identification du plastifiant alternatif au DEHP par GC-MS.

Une tentative d'identification du plastifiant alternatif au DEHP est réalisée par une analyse par GC-MS; les chromatogrammes obtenus avec l'extrait du PVC (sans phtalates) et une solution standard de DEHP sont représentés dans la Figure 5.13. L'allure des chromatogrammes obtenus confirme l'absence du DEHP dans le nouveau matériau en PVC déclaré sans phtaltes.

Aussi, les chromatogrammes obtenus pour deux lots de matières premières provenant de deux fournisseurs différents, à savoir (Cabopol et Résilia) sont identiques, ce qui indique qu'il s'agit du même matériau.

Les résultats de l'analyse par GC-MS avec les propositions de composés par la librairie sont reportés dans le Tableau 5.7.

L'analyse par GC-MS a mis en évidence la présence du Bromure de Benzoyle (avec une probabilité de 50%) et d'un mélange d'oléate d'éthyle et d'acide oléique avec une probabilité $>$ à 90% (spectre de masse représenté par la Figure C1, Appendice C).

Le mélange d'oléate d'éthyle et d'acide oléique peut être obtenu à partir d'acides gras provenant d'huiles végétales (comme l'huile de soja, de colza, de lin, de tournesol...) et il peut être utilisé comme bio-plastifiant dans les polymères notamment le PVC [10, 113].

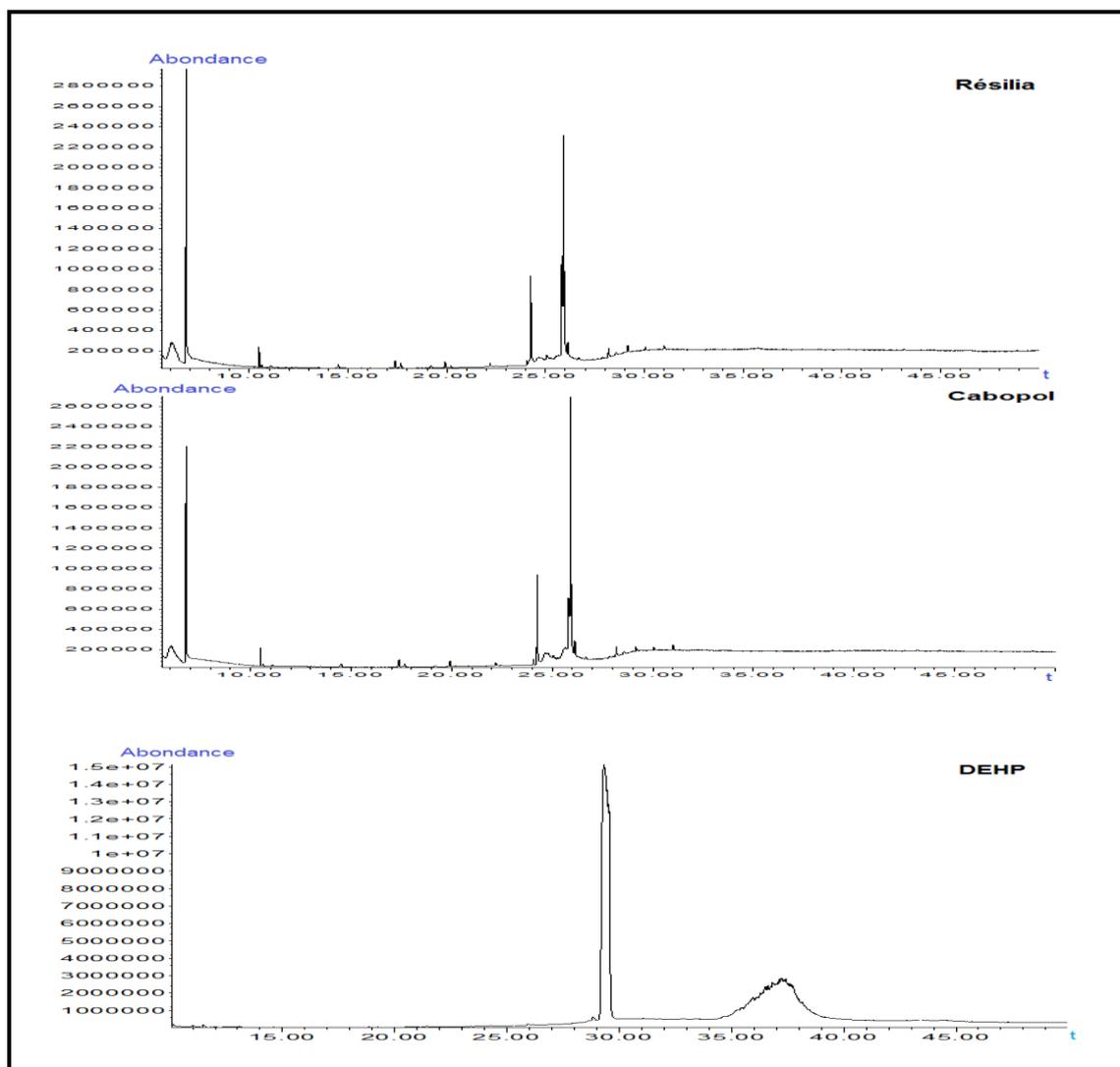


Figure 5.13 : Chromatogrammes GC-MS des extraits du PVC plastifié (sans phtalates) et d'une solution de référence de DEHP.

Ces résultats sont intéressants mais surtout rassurant du fait de l'élimination du DEHP du nouveau matériau en PVC pour dispositifs médicaux mais surtout par son remplacement par un plastifiant d'origine naturelle comme alternatif présentant un moindre risque dans le cas d'un relargage éventuel.

Tableau 5.7 : Résultats de l'analyse par GC-MS.

Fournisseur : Cabopol						
Pics les plus abondants	m/z	Tr	Intensité	Noms de composés	Probabilité (%)	% dans le mélange
1	105- 77- 51	6,80	2567225	Bromure de Benzoyle	50	18,79
2	41- 55- 43	25,82	1010270	acide oléique	99	8,29
3	55- 69- 41	25,92	2179915	oléate d'éthyle	99	31,12
Fournisseur : Résilia						
Pics les plus abondants	m/z	Tr	Intensité	Noms de composés	Probabilité (%)	% dans le mélange
1	105- 77- 51	6,79	2006503	Bromure de Benzoyle	50	23,19
2	41- 55- 43	25,81	582059	acide oléique	98	15 ,67
3	55- 69- 41	25,91	2480266	oléate d'éthyle	95	21,10
Solution référence de DEHP						
Pics les plus abondants	m/z	Tr	Intensité	Noms des composés	Probabilité (%)	% dans le mélange
1	149- 167- 57	29,31	14701222	Di-(2-ethylhexyl) phtalate	91	98,33

5.3 Conclusion.

Dans cette étude, une méthodologie analytique est proposée pour évaluer le taux de DEHP dans le PVC à usage parentéral (tubulure, poche..); l'application a été réalisée sur deux types de matériaux, du PVC plastifié au DEHP qui est toujours autorisé par la Ph. Eu. et du PVC (déclaré sans phtalates) utilisé dans les services de pédiatrie, maternité et néonatal.

Des méthodes d'analyse fiables pour l'analyse du DEHP par spectrométrie UV et par chromatographie HPLC sont proposées. L'optimisation du procédé d'extraction du plastifiant à partir du PVC a donné les bons rendements (> 95%) en utilisant la méthode indirecte par solubilisation - reprecipitation (THF / éthanol) avec une bonne reproductibilité (CV < 5%).

L'analyse des poches et MP en PVC plastifié au DEHP a donné des taux de DEHP conformes aux limites autorisée par la Ph. Eu..

Cette méthodologie, appliquée au PVC déclaré sans phtalates a permis de confirmer l'absence du DEHP dans ce dernier.

Les résultats très satisfaisants obtenus avec le nouveau matériau (sans phtalates) permettent de proposer cette méthodologie pour l'analyse du plastifiant alternatif dans le PVC plastifié après acquisition de substance de référence.

Cette méthodologie, très simple peut être appliquée pour l'analyse du DEHP dans les DM en PVC plastifié; la spectrométrie UV étant plus rapide, elle peut être adaptée dans les contrôles de routine alors que la chromatographie peut être utilisée pour confirmer les résultats.

La tentative d'identification du plastifiant alternatif par GC-MS a permis de mettre en évidence la présence d'un bio-plastifiant naturel à base d'acides gras (acide oléique et oléate d'éthyle); ce résultat est très rassurant et confirme la volonté des entreprises algériennes pour se mettre à niveau des exigences réglementaires internationales afin d'assurer la qualité et la sécurité de leurs produits.

6 APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE INFRA-ROUGE A TRANSFORMEE DE FOURRIER (FTIR) A L'EVALUATION DES PHENOMENES D'INTERACTION CONTENU-CONTENANT (COMPRIMES / BLISTERS).

Les interactions contenu-contenant couvrent les phénomènes de migration des additifs du conditionnement plastique vers la forme pharmaceutique et ceux liés à la sorption (adsorption ou diffusion) de certains composants du médicament dans le conditionnement. La grande difficulté pour évaluer ces interactions est liée beaucoup plus aux phénomènes de migration qui sont très complexes et nécessitent plus d'informations et surtout des moyens analytiques très performants.

En ce qui concerne les phénomènes de sorption, il est plus facile de les mettre en évidence par le suivi de la teneur du principe actif ou excipient lors du contrôle qualité du médicament ou pendant l'étude de sa stabilité dans son conditionnement primaire par des méthodes qui sont souvent décrites dans les pharmacopées ou mises au point et validées par les laboratoires pharmaceutiques. Nombreuses sont les études qui ont démontré ce type de phénomène [18, 114] qui peut engendrer des pertes importantes de principe actif et des conséquences graves sur le patient du fait de la diminution de la dose thérapeutique administrée surtout dans le cas de transfusion.

Dans cette étude, une méthodologie analytique simple est proposée afin d'évaluer les phénomènes d'interactions contenu-contenant. Celle-ci peut être appliquée lors du suivi des études de stabilité réalisées sur le médicament mais au lieu de suivre uniquement la stabilité de la forme pharmaceutique (contenu), une vérification de celle du contenant (article de conditionnement plastique) est réalisée simultanément par une technique très simple mais très performante à savoir la spectrométrie dans l'infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR).

6.1 Matériel et méthodes.

La méthodologie proposée a été appliquée à deux médicaments de forme sèche à savoir, le paracétamol et le captopril/hydrochlorothiazide (association de médicaments).

6.1.1 Echantillons utilisés.

- Paracétamol 500 mg (antalgique, antipyrétique non salicylé, symptomatique de la fièvre et des douleurs d'intensité faible), un comprimé sécable conditionné dans un blister en poly(chlorure de vinyle). Il s'agit du PVC, $-(CH_2-CHCl)_n-$ sous forme de film rigide transparent de couleur légèrement bleue (Ech 1).
- Captopril/Hydrochlorothiazide (50 mg/25 mg, deux antihypertenseurs, à effets vasculaire et diurétique, respectivement). Il s'agit d'un comprimé nu sécable, de couleur jaune-orangée, de 8 mm de diamètre, conditionné dans un blister en poly(chlorure de vinyle)/poly(chlorure de vinylidène) il s'agit du PVC/PVDC, $-(CH_2-CHCl)_n-$ / $-(CH_2-CCl_2)_n-$ sous forme de film rigide en PVC enduit d'une couche de PVDC de couleur légèrement grise (Ech2).

Pour chaque médicament, des lots d'échantillons des années 2015, 2016 et 2017 sont utilisés avec un lot périmé (< 2014). Le lot périmé est utilisé pour confirmer les résultats.

Les deux médicaments sélectionnés dans cette étude sont déjà commercialisés. Leur conformité a été démontrée lors des études de stabilité dont les résultats sont consignés dans leurs dossiers d'AMM correspondants. L'étude a porté uniquement sur l'évaluation de la stabilité du conditionnement plastique tout au long de la durée de validité du médicament.

6.1.2 Préparation et analyse des échantillons par FTIR.

Pour chaque échantillon, les comprimés ont été retirés des blisters (Figure 6.1). La partie alvéole a été découpée et nettoyée avec du papier filtre; cette partie est sélectionnée car c'est elle qui rentre directement en contact avec le produit. Après sélection des alvéoles présentant la même épaisseur, une analyse directe des films est réalisée par FTIR (Jasco FTIR 4100) entre 400 et 4000 cm^{-1} en fixant le centre de l'alvéole.



Figure 6.1 : Préparation des alvéoles pour analyse par FTIR

Les spectres obtenus sont traités grâce au logiciel IR-Solution. Les bandes de vibration spécifiques aux matériaux PVC et PVC/PVDC sont identifiées grâce aux spectres de références (base de données Aldrich) et le reste des bandes désignées par bandes secondaires, est attribué aux composés (additifs ou autres) présents dans le polymère plastique (sans spécification).

Grâce aux performances du logiciel de traitement IR-Solution qui permet de relever toutes les bandes de vibration ainsi que leurs surfaces respectives, un suivi des variations de ces bandes secondaires en fonction du temps de conservation est réalisé pour les deux conditionnements comparativement à celles observées sur un spectre obtenu par analyse des matériaux avant leur mise en contact avec les produits (T0); ce qui permet de statuer sur la stabilité de ces derniers.

6.2 Résultats et discussion.

6.2.1 Analyse des alvéoles des différents blisters par FTIR.

L'analyse directe par FTIR des blisters en PVC ($222 \pm 20 \mu\text{m}$) et en PVC/PVDC ($243 \pm 20 \mu\text{m}$) à T0 (avant l'opération de conditionnement) a permis d'identifier les polymères grâce à leurs bandes caractéristiques. La Figure 6.2 représente le spectre obtenu dans le cas du PVC et les bandes spécifiques de ce dernier sont reportées dans le Tableau 6.1.

Les bandes de vibration observées dans le cas du PVC sont en accord avec celles mentionnées dans la monographie de la pharmacopée Européenne [115] et celles retrouvées en littérature [116-119].

Tableau 6.1 : Résultats des vibrations observées dans le cas du PVC

PVC	
Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Groupement fonctionnel
2967, 2916, 2850, 1332	CH ₂ ; CH vibrations de valence et de déformation
1426	CH ₂ vibration de déformation
1254	CH vibration de déformation (hors plan)
693, 615	C-Cl vibration de valence

Dans le cas du PVC/PVDC, ce matériau est obtenu par vernissage, en multicouche de PVDC sur l'une des faces du PVC, qui a reçu préalablement un primaire d'accrochage ou colle en polyuréthane. L'avantage de ce matériau multicouche est qu'il permet une protection du médicament améliorée vis-à-vis de l'humidité (barrière) par rapport au PVC simple [120].

En effet, la perméabilité à la vapeur d'eau du PVC est réduite lorsqu'il est revêtu par d'autres polymères comme le PVDC qui possèdent des caractéristiques comparables à celles du PVC mais une perméabilité à la vapeur d'eau réduite d'un facteur de 5 à 10.

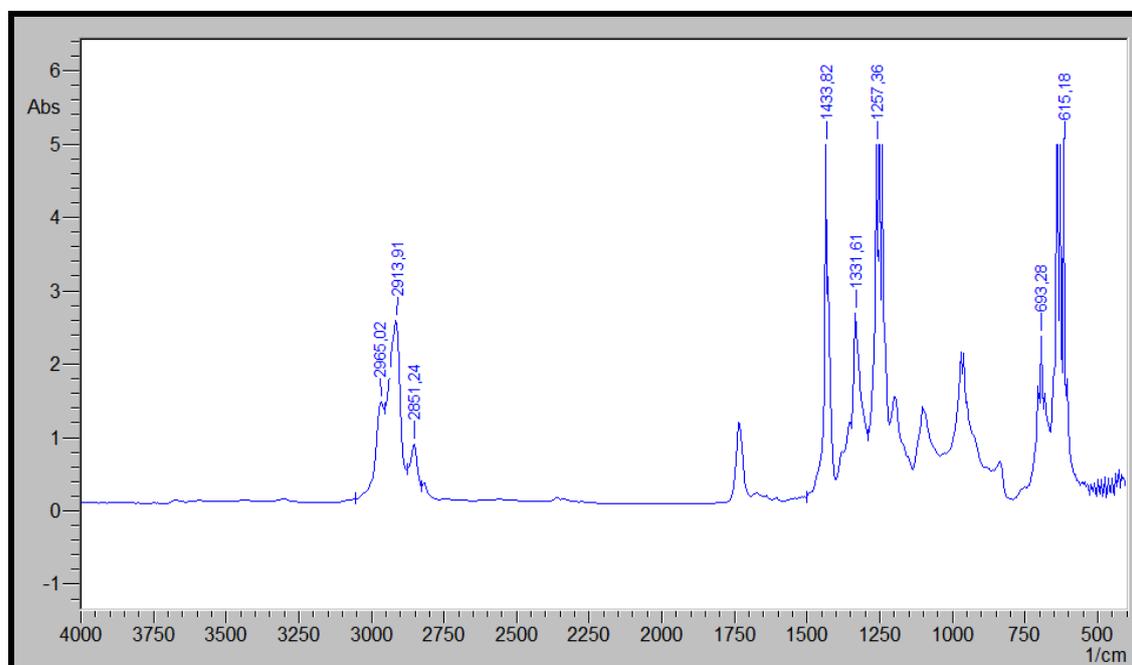


Figure 6.2 : Spectre FTIR du film en PVC avant conditionnement (à T0).

Le spectre obtenu pour le PVC/PVDC à T0 est similaire à celui du PVC. En effet, ce matériau est constitué d'une couche épaisse en PVC induite d'un film fin en PVDC dans la proportion (260g PVC/ 40g PVDC)/m² de matériau, ce qui ne permet pas de mettre en évidence les bandes spécifiques au PVDC.

6.2.2 Suivi de l'évolution des bandes de vibration par FTIR.

En plus des bandes spécifiques aux matériaux, les spectres FTIR ont présenté des bandes secondaires (voir Figure 6.2 dans le cas du PVC) dont les nombres d'ondes et les surfaces sont reportées dans les Tableaux D1 et D2 (Appendice D). Elles peuvent être attribuées aux additifs, aux résidus de polymérisation ou aux impuretés.

Selon la monographie de la Ph. Eu. [115], le PVC utilisé dans la fabrication des blisters peut contenir différentes huiles comme l'huile de soja époxydée, des huiles hydrogénées, des acides ou des esters d'acides gras aliphatiques, des cires, de la paraffine, des esters de macrogol, du sorbitol, du phosphite de 2,4-dinonylphényle, du phosphite de di(4-nonylphényle) ou du phosphite de tris (nonylphényle), des stabilisants, des pigments, des colorants et des opacifiants. Ces additifs permettent de conférer aux matériaux des caractéristiques ou propriétés en fonction de leur usage (stabilité, résistance, machinabilité...). Ils sont autorisés à des limites bien définies.

Les Figures 6.3 et 6.4 représentent les histogrammes relatifs à l'évolution des surfaces des bandes secondaires en fonction des différentes durées de conservation (durée de contact entre le matériau et le médicament).

Les histogrammes correspondant aux variations de surfaces dans le cas des blisters en PVC et PVC/PVDC montrent que les bandes spécifiques aux polymères plastiques restent pratiquement stables dans leur majorité; les quelques variations relevées restent négligeables et peuvent être attribuées à l'épaisseur du matériau qui n'est pas toujours constante.

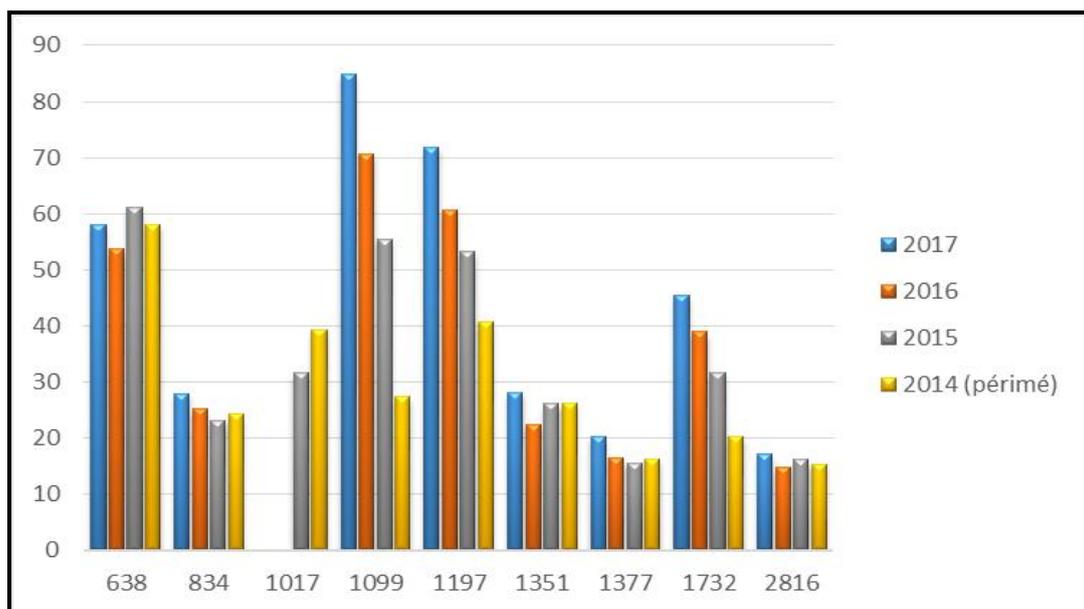


Figure 6.3 : Variation de la surface des bandes secondaires dans le cas du PVC.

En ce qui concerne les bandes secondaires, les variations de surfaces constatées sont aléatoires et non significatives sauf pour certaines d'entre elles qui sont représentées dans le tableau 6.2.

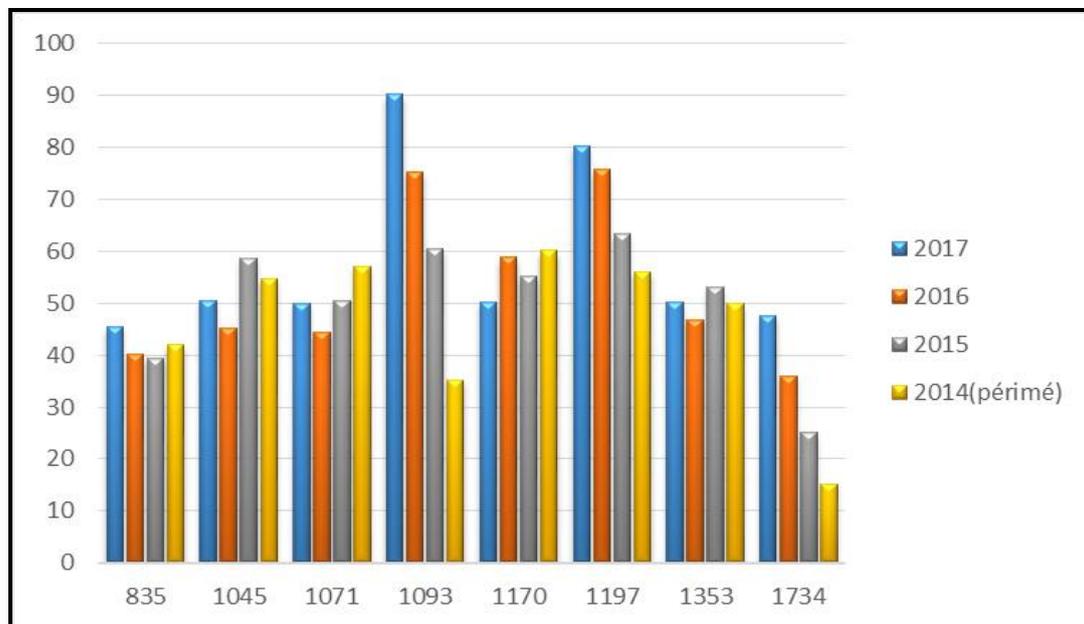


Figure 6.4 : Variation de la surface des bandes secondaires dans le cas du PVC/PVDC.

Tableau 6.2 : Evolution des surfaces des bandes secondaires dans le cas du PVC et PVC/PVDC (écarts types pour n = 6).

Année	1090 cm ⁻¹		1197 cm ⁻¹		1732 cm ⁻¹	
	PVC	PVC/PVDC	PVC	PVC/PVDC	PVC	PVC/PVDC
2017	84,91 ± 1,25	90,29 ± 1,80	71,87 ± 0,98	80,29 ± 3,09	45,32 ± 1,88	47,68 ± 1,98
2016	70,68 ± 1,15	75,32 ± 2,15	60,66 ± 1,34	75,71 ± 2,27	38,96 ± 1,98	35,90 ± 2,65
2015	55,46 ± 0,25	60,61 ± 2,35	53,62 ± 1,05	63,42 ± 1,85	31,57 ± 1,05	25,20 ± 3,33
2014	27,46 ± 1,50	35,23 ± 1,25	40,62 ± 1,85	56,09 ± 2,76	20,27 ± 1,11	15,20 ± 2,43

a. Cas d'un phénomène de relargage.

Une diminution de la surface de la bande située à 1730 cm⁻¹ est observée dans le cas du PVC et PVC/PVDC en fonction du temps de contact (Figure 6.5); elles sont de 45,32 cm⁻¹ (2017), 38,96 cm⁻¹ (2016), 31,57 cm⁻¹ (2015) et 20,27 cm⁻¹ (2014) dans le cas du PVC et de 47,68 cm⁻¹ (2017), 35,90 cm⁻¹ (2016), 25,20 cm⁻¹ (2015) et 15,20 cm⁻¹ (2014) dans le cas du PVC/PVDC.

Cette diminution de surfaces de la bande ne peut être attribuée qu'à un phénomène de migration d'un composé du matériau (blister) vers le contenu.

Les constats sont les mêmes pour les bandes à 1090 cm⁻¹ et 1190 cm⁻¹ pour les deux matériaux où l'évolution de surfaces en fonction du temps de contact marque un phénomène de migration (Figure 6.6).

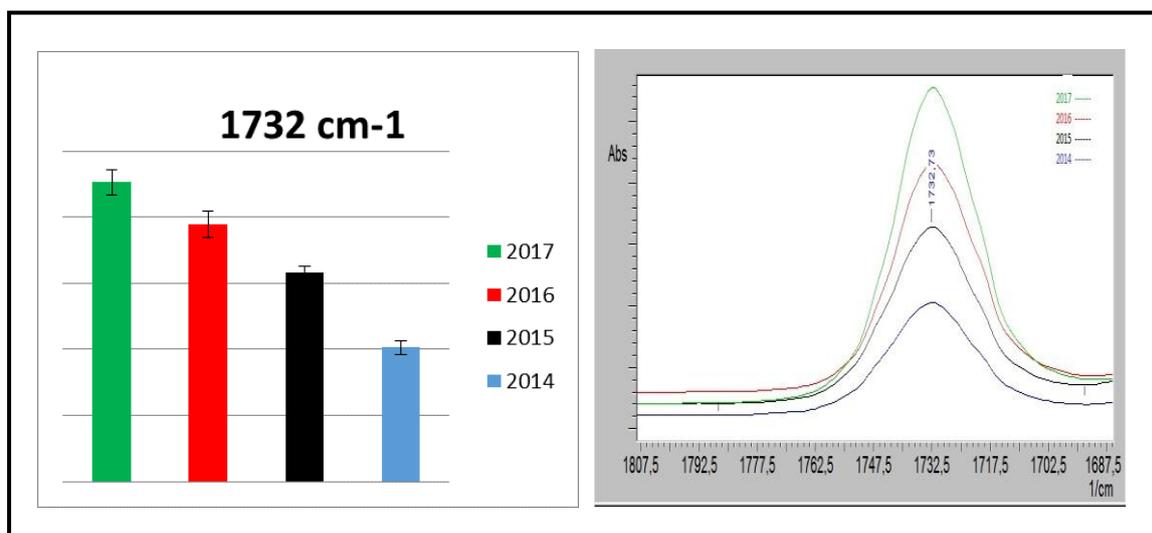


Figure 6.5 : Evolution de la bande à 1730 cm⁻¹ (dans le cas du PVC).

a. Cas d'un phénomène d'adsorption.

L'apparition d'une bande aux environs de 1017 cm^{-1} et l'augmentation de sa surface en fonction du temps de contact a été observée dans le cas des alvéoles en PVC. Ceci peut représenter un phénomène d'adsorption de composés du comprimé sur les parois du conditionnement (Figure 6.7).

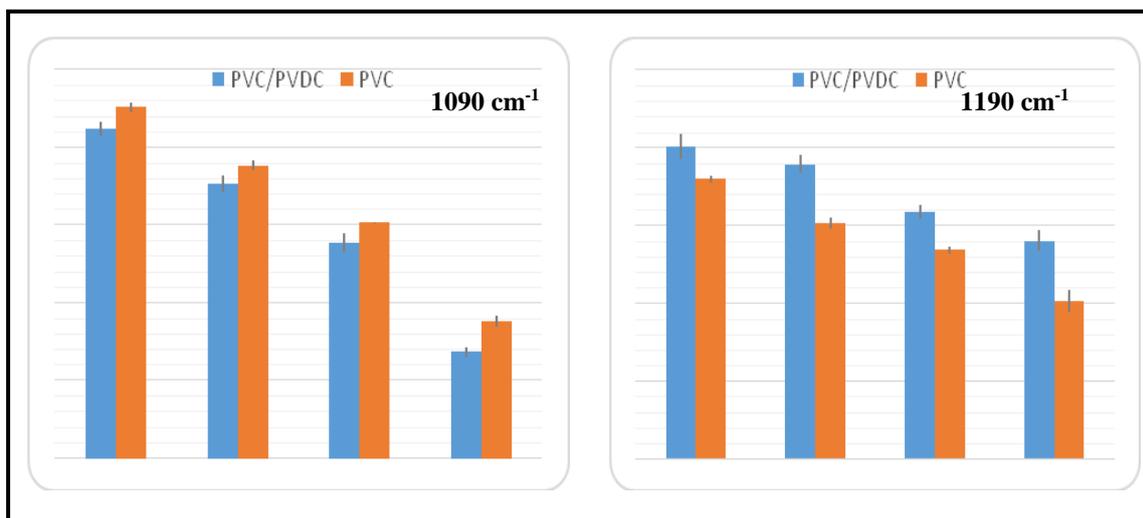


Figure 6.6: Evolution des bandes à 1090 et 1190 cm^{-1} dans les cas du PVC et PVC/PVDC.

Contrairement au blister PVC/PVDC, ce phénomène n'a pas été observé, ce qui est en corrélation avec les évolutions industrielles en matière de conditionnement qui favorisent l'utilisation de multicouches dont les propriétés sont meilleures (plus d'inertie avec un effet barrière plus important).

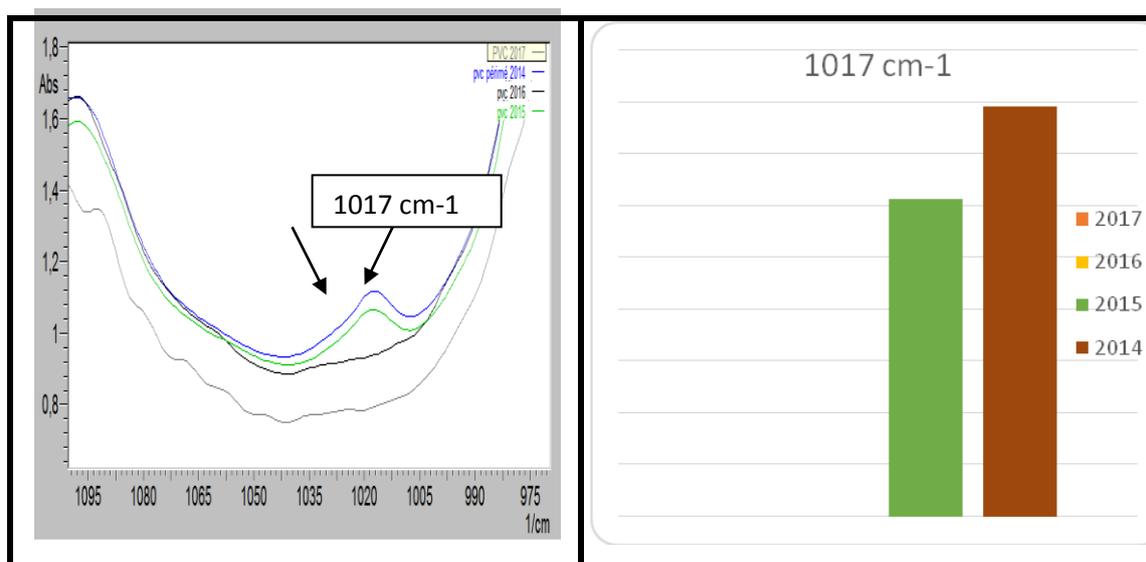


Figure 6.7 : Evolution de la bande à 1017 cm^{-1} dans le cas du PVC.

La spectrométrie IR est une méthode standard utilisée dans des analyses qualitatives dans différents domaines [119]. Elle est préconisée pour l'identification des matières premières pharmaceutiques ainsi que les matières plastiques utilisées dans la fabrication des articles de conditionnement [28, 52, 121-123].

Plusieurs auteurs l'ont exploitée pour le suivi de l'évolution des propriétés physico-chimiques des matériaux plastiques [98, 124] et pour mettre en évidence les phénomènes d'adsorption et de relargage [27, 96, 114, 125, 126].

Dans notre étude, la spectrométrie FTIR a permis de mettre en évidence les phénomènes d'interaction contenu-contenant entre le blister et le comprimé. La confirmation des résultats de relargage par la recherche des additifs ayant migré dans la forme pharmaceutique est quasi impossible du fait du manque d'informations sur la composition des matériaux de conditionnement utilisés. Quant au phénomène de sorption, les résultats des contrôles réalisés sur le produit paracétamol dans le cas du blister en PVC sont conformes (produit enregistré et mis sur la marché), ce qui signifie que la variation observée par FTIR liée à ce phénomène est faible et sans conséquences sur la qualité du produit.

La réglementation pharmaceutique est très exigeante en ce qui concerne la qualité des matériaux plastiques utilisés dans les conditionnements et leur compatibilité avec les formes pharmaceutiques. Néanmoins, ces phénomènes sont souvent négligés dans le cas de formes solides, (comprimés, gélules). En effet, les échanges entre le contenu et le contenant sont faibles du fait de l'absence de solvants qui sont souvent responsables de l'extraction des additifs (contaminants) à partir du polymère par pénétration et solubilisation de ces derniers. L'étude de compatibilité n'est exigée que dans le cas de forme sèche à usage ophtalmique ou parentéral [45].

Des facteurs multiples sont responsables de ces phénomènes liés, d'une part, au contenant (sa structure (cristalline ou amorphe), son procédé de fabrication (type d'amorceurs, de catalyseurs...), types d'adjuvants technologiques (charges, plastifiants, lubrifiants, stabilisants, leurs tailles et concentrations,...) et, d'autre part, au contenu (la forme pharmaceutique (solide, liquide, pâteuse...)), les caractéristiques physico-chimiques (pH, polarité, ...) en plus des conditions de stockage (temps, surface, température ...), ce qui rend leur étude complexe.

Devant l'ampleur des variables responsables de ces mécanismes de transferts et de la dissymétrie des connaissances partagées entre le fabricant de l'article de conditionnement et son utilisateur, une approche méthodologique ou des guides [6, 45, 128-130] ainsi que des modèles mathématiques complexes basés sur des lois thermodynamiques et cinétiques [38, 131, 132] sont proposés pour évaluer les niveaux potentiels de migration et prédire d'éventuel risque de contamination.

Dans tous les cas, il est impératif que les producteurs des articles de conditionnement plastiques puissent démontrer la sécurité sanitaire de leurs produits dès la phase de conception en respectant l'utilisation de substances chimiques comme additifs conformément au règlement REACH (2007) [8] et que les industriels pharmaceutiques puissent confirmer la qualité et la sécurité des médicaments mis sur le marché. Ceci ne peut se produire qu'avec une collaboration étroite entre les deux parties pendant la phase de développement de produit basée sur un partage d'informations, le respect de la confidentialité et la fidélité pour un intérêt commun, la santé publique.

L'utilisation de la spectrométrie FTIR a pu démontrer les phénomènes d'interaction contenu-contenant par le changement du profile du spectre de l'article de conditionnement (apparition ou disparition de bandes d'absorption, évolution de leurs surfaces) mais dans le cas d'un éventuel phénomène de migration, il est difficile même impossible pour l'industriel pharmaceutique d'identifier ou de quantifier les relargables car ceci nécessite la connaissance de leur nature, la disposition de substances de références ainsi qu'un arsenal analytique des plus performants. Cette approche méthodique du problème est très intéressante car elle est simple, non destructive, de mise en œuvre facile (par son application directe sur un échantillon en faible quantité) [73] et peut révéler d'éventuels échanges entre le contenu et le contenant.

6.3 Conclusion.

L'analyse par spectrométrie FTIR a permis :

- l'identification du conditionnement plastique grâce à ses bandes spécifiques ;
- la vérification de sa pureté par la mise en évidence de bandes secondaires ;
- le suivi des phénomènes d'interaction contenu-contenant par le suivi de l'évolution de ces bandes en fonction du temps de contact.

Dans cette étude, les variations observées relatives aux phénomènes de migration et d'adsorption, sont faibles du fait de la forme pharmaceutique solide des médicaments traités, mais elles ont pu démontrer des échanges entre le contenu et le contenant.

Dans l'attente d'un partenariat entre le producteur du matériau plastique et son utilisateur, cette méthodologie peut être exploitée par les industriels pharmaceutiques pour évaluer la stabilité de leurs produits et leur compatibilité avec leurs conditionnements primaires.

Pour son application, il est nécessaire que le producteur du matériau assure la même qualité du produit fourni (formule, caractéristiques physiques comme l'épaisseur) ou informe de tout changement effectué sur le polymère.

Par ailleurs, l'industriel pharmaceutique doit se munir de spectrophotomètre FTIR qualifié pour garantir la fiabilité de ses résultats. Dans le cas de multicouches où de films présentant une épaisseur importante, l'ATR (spectrométrie à réflexion totale atténuée) peut être appliquée directement sur la surface du polymère qui rentre en contact direct avec le produit.

La méthode proposée dans cette étude peut aisément être adoptée du fait de la simplicité de la technique FTIR et surtout de l'ampleur des informations qu'elle fournit pouvant ainsi orienter l'industriel sur une prise de décision sur la qualité du médicament.

7 APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE (GC-MS) À L'ÉVALUATION DES PHÉNOMÈNES DE MIGRATION DES PLASTIFIANTS DANS LES POUCHES POUR PERFUSION.

Introduction.

Le problème de migration des additifs de matières plastiques vers un contenu pharmaceutique, surtout quand ce dernier est sous une forme liquide, a été soulevé. Cependant, il a été négligé dans le cas de solutions aqueuses du fait que les additifs sont souvent insolubles dans l'eau.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la recherche de relargables dans des milieux purement aqueux, à savoir les solutions pour perfusion de chlorure de sodium (NaCl) et de glucose conditionnées dans des poches en plastique. Ces deux sérums sont très utilisés comme véhicules de médicaments pour des traitements hospitaliers et leur choix est basé sur l'ampleur du risque lié à la voie d'administration intraveineuse en cas de présence de ces migrants. Pour cela, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Proposer une méthode par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS), fiable pour l'analyse d'une série d'additifs susceptibles d'être présents. Ces additifs sont les phtalates (DMP, DEP, DBP, BBP et DEHP), un adipate (DEHP), les phénols (OP, NP) et la benzophénone (BP). Ce choix est basé sur la disponibilité de substances de référence de ces composés.
- Proposer deux procédés efficaces, LLE et SPE, pour l'extraction de ces additifs à partir du sérum.
- Appliquer la méthodologie d'extraction et d'analyse proposée pour :
 - Le suivi des essais de migration de ces additifs à partir de matières premières plastiques (granulé et film) en PVC;
 - L'analyse de ces additifs dans les solutions aqueuses pour perfusion de NaCl à 0,9% et de glucose à 5% conditionnées dans des poches en plastique.

7.1 Matériel et méthodes.

Les substances de référence des additifs et les réactifs utilisés ainsi que leurs références sont résumés dans le Tableau 7.1.

Les poches pour perfusion de 500mL contenant du NaCl à 0,9% et du glucose à 5% en PVC plastifié et en multicouches ainsi que les matières premières en PVC sous forme de granulé et film, ont été récupérés de firmes pharmaceutiques Algériennes (IMC et SAIDAL).

Tableau 7.1 : Matériel, substances de référence et réactifs utilisés.

Standards et réactifs	Références
Phtalates Mix 525 (mélanges de phtalates à 500ng/ μ L chacun dans le méthanol) contenant : Phtalate de diméthyle (DMP), Phtalate de diéthyle (DEP), Phtalate de di- <i>n</i> -butyle (DBP), Phtalate de butyle et benzyle (BBP), Phthalate de di- (2-éthylhexyle) (DEHP)	Supelco (Bellefonte, PA, Etats-Unis)
Adipate de di- (2-éthylhexyle) (DEHA)	Supelco (Bellefonte, PA, Etats-Unis)
Nonylphénol (NP)	Riedel-de Hën (Seelze, Allemagne)
Mélange d'isomères du 4-tert-octylphénol (OP)	Supelco (Bellefonte, PA, Etats-Unis)
Benzophénone (BP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Etats-Unis)
Cartouches pour extraction en phase solide SPE 200 mg Oasis HLB	Waters (Milford, MA, USA)
Dispositif d'aspiration	Baker (produit n ° 7018-94, J.T. Baker, Deventer, Pays-Bas)
Solvants de grade HPLC, méthanol, dichlorométhane, acétone, <i>n</i> -hexane, acétate d'éthyle, Eau ultra-pure (Milli-Q water)	Merck (Darmstadt, Allemagne). Merck (Darmstadt, Allemagne).
Azote (pureté > 99%)	Air Liquid (Barcelona, Espagne).
NaCl et glucose (réactifs de laboratoire)	Merck (Darmstadt, Allemagne)

7.1.1 Etude de la fiabilité de la méthode d'analyse GC-MS.

Une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse quadripolaire Trace GC 2000 (GC-MS) a été utilisée (Thermo Electron Corporation, San José, Californie, États-Unis). Cette technique a été inspirée d'une étude antérieure avec certaines modifications [133].

Les conditions chromatographiques sont :

- L'ionisation électronique est réalisée à 70 eV ;
- Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à un débit constant de 1,2 mL/min ;
- La colonne utilisée est en silice fondue DB-5MS (30 mx 0,25 mm x 0,25 µm) de J & W Scientific (Folsom, CA, USA) ;
- La température du four est programmée de 70 °C (pendant 2 min) à 135°C à 10°C/min, à 160°C à 3°C/min, à 175°C à 1°C/min, à 195°C à 3°C/min et finalement à 310°C à 10 °C/min et le maintien de cette température pendant 5 min.
- Le volume injecté est de 2 µL en mode splitless, en maintenant la vanne split fermée pendant 1 min.
- Les températures de l'injecteur, de l'interface GC et de la source d'ions étaient respectivement de 280 °C, 280 °C et 200 °C.
- L'acquisition des données a été réalisée par la surveillance d'ions sélectionnés (SIM) en mode de balayage (70-500 amu) grâce au logiciel X-calibur.

La méthode d'étalonnage externe a été utilisée afin d'identifier et de quantifier les composés recherchés dans le sérum grâce au temps de rétention et au spectre de masse.

La recherche de relargables provenant de conditionnements plastiques est très complexe du fait de leurs diversités et de leur présence à l'état de traces dans le milieu contaminé mais la grande difficulté réside dans leur omniprésence dans l'environnement induisant des interférences lors de leur analyse.

Dans notre étude et afin de s'assurer de la fiabilité de notre méthode d'analyse, nous avons vérifié :

- la linéarité de la réponse du détecteur dans le domaine des concentrations sélectionnées ;
- la répétabilité et la reproductibilité des analyses (précision) ;
- la limite de détection pour évaluer la sensibilité de la méthode mais en tenant compte la contribution des blancs (liée aux contaminations externes) [83, 134-136].

L'étude de la linéarité est vérifiée pour une gamme d'étalonnage préparée avec des solutions standards contenant un mélange de composés aux concentrations comprises entre 0,01 µg/mL et 1,5 µg/mL dans l'acétate d'éthyle.

La répétabilité est vérifiée avec 5 injections consécutives d'une solution standard contenant un mélange de composés à 0,3 µg/mL et la reproductibilité en injectant la même solution pendant 5 jours consécutifs.

Pour la détermination de la limite de détection de la méthode (LDM), nous avons recherché les différents composés dans des solutions à blanc afin d'évaluer les interférences et contributions externes liées à l'environnement du laboratoire et aux opérations de manipulation (extraction et analyse); Il s'agit de solutions de NaCl et de glucose sans dopage en contaminants préparées comme il est décrit dans la procédure d'extraction citée ci-dessous.

En cas d'absence de ces derniers dans les blancs, la LDM sera déterminée en utilisant les solutions BC de NaCl et de glucose, chargées à 1µg/L (voir la préparation dans procédure d'extraction décrite ci-dessous).

7.1.2 Procédure d'extraction des relargables.

Afin d'évaluer le taux de contaminants provenant de conditionnements plastiques dans le contenu, il est nécessaire de procéder à l'extraction de ces derniers surtout lorsqu'ils se retrouvent à l'état de traces. Les plastifiants, et en particulier le DEHP, sont omniprésents dans l'environnement et, par conséquent, un soin particulier a été apporté pour éviter la contamination externe lors de la manipulation des échantillons:

- Aucun contact avec d'autres matériaux plastiques à l'exception des cartouches d'extraction Oasis SPE qui sont en polypropylène ;
- Tous les réactifs et solvants sont de bonne qualité (grade HPLC) ;
- La verrerie est nettoyée à l'aide d'Extran (Merck, Darmstadt, Allemagne), rincée à l'eau distillée et à l'acétone et stérilisée dans un four à 450 °C pendant une nuit entière.

Pour extraire les plastifiants à partir de solutions pour perfusion de NaCl et de glucose, nous avons proposé deux procédés qui sont l'extraction en phase solide (SPE) et l'extraction liquide-liquide (LLE). Les deux méthodes d'extraction sont appliquées sur les échantillons (100 mL dans le cas des essais de migration et 250 mL dans le cas des poches pour perfusion) et l'analyse est effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

a. Extraction en phase solide SPE.

La méthode SPE est inspirée d'une étude réalisée sur la recherche des additifs de matières plastiques dans l'eau minérale [137]. Les cartouches de type Oasis HLB 200 mg SPE de 6 mL sont placées dans un appareil Baker SPE-12G et sont conditionnées successivement avec 10 mL d'hexane, 10 mL de dichlorométhane, 10 mL de méthanol et 15 mL d'eau de qualité HPLC.

L'échantillon est ensuite introduit dans la cartouche par aspiration grâce à une pompe. Après son élution complète, les cartouches sont séchées dans un système sous vide pendant environ 60 minutes, puis une élution goutte-à-goutte à une vitesse d'environ 1mL/min est réalisée avec 10 mL d'un mélange dichlorométhane/hexane (1/1) puis 10mL d'un mélange dichlorométhane/acétone (1/1) pour récupérer tous les additifs retenus par la résine.

Les extraits sont recueillis dans un flacon ambré de 40 ml et évaporés à sec sous un courant d'azote dans un système TurboVap LV (Caliper Life Sciences, Royaume-Uni). Le résidu est récupéré avec 500 µL d'acétate d'éthyle et transféré dans une vial pour chromatographie.

b. Extraction liquide-liquide LLE.

Dans cette technique, nous avons procédé comme suit : Les échantillons sont introduits dans une ampoule à décanter de 500 mL avec 40 mL de dichlorométhane comme solvant d'extraction. La solution est agitée vigoureusement pendant 20min. avec une purge périodique pour libérer l'excès de pression (réaction exothermique). Le mélange est laissé au repos pendant une durée de 10min ou plus afin de permettre une bonne séparation des deux phases aqueuse et organique (dans le cas de formation de trouble, la séparation prend plus de temps).

La phase organique est récupérée dans un flacon de 40 mL, évaporée à sec et reconstituée comme c'est indiqué dans le procédé SPE.

7.1.3 Vérification de l'efficacité de la méthode d'extraction des relargables.

Pour évaluer l'efficacité des deux procédés SPE et LLE proposés, des extractions sont appliquées sur 250 mL de solution de NaCl à 0,9% et de glucose à 5% (préparées au niveau du laboratoire, en dissolvant les quantités nécessaires de réactifs dans de l'eau Milli-Q). Celles-ci ont été chargées (dopées) à 1 µg/L (basse concentration BC) et à 10 µg/L (haute concentration HC) du mélange d'additifs, ce qui pourrait correspondre à un large intervalle de teneurs de plastifiants attendues dans les poches pour perfusion.

La contribution du blanc a été évaluée en effectuant des extractions SPE et LLE sur les mêmes solutions de NaCl à 0,9% et de glucose à 5% sans dopage en additifs.

Trois essais sont réalisés dans chaque cas et les rendements d'extraction sont déterminés pour les deux procédés par GC-MS.

7.1.4 Application de la méthode aux essais de migration de relargables à partir de matière première (granulés et films) en PVC.

La méthodologie proposée dans cette étude a été appliquée aux études de migration de plastifiants à partir de matières premières en PVC sous forme de granulé ($3,5 \pm 10\%$ de diamètre) et de film (220 µm d'épaisseur) utilisés dans la fabrication de dispositifs médicaux afin de les comparer aux exigences réglementaires existantes.

Les essais sont réalisés selon la directive européenne 2011/10 / UE [7] bien que cette dernière soit destinée au domaine de l'industrie alimentaire.

Une masse de 1,5 g de matière première, sous forme de granulé ou film (préalablement découpé en morceaux de 2x2 cm²) a été introduite dans des flacons en Pyrex contenant 100 mL d'eau minérale. Les flacons ont été fermés avec des bouchons en téflon protégés par des feuilles de papier aluminium pour éviter tout contact avec le plastique. L'essai a été réalisé dans un autoclave de stérilisation à la vapeur, à une température de 121°C pendant une durée de 20min, simulant les conditions réelles de fabrication de poches pour perfusion.

Selon la même directive, l'eau est le milieu le plus approprié pour simuler les solutions aqueuses pour perfusion de NaCl ou de glucose. Des conditions similaires sont décrites dans la Ph. Eu. pour évaluer la migration globale de contaminants à partir du matériau en PVC à usage parentéral [25]. Une fois l'essai réalisé, une extraction est effectuée sur 100mL d'eau récupérée.

7.1.5 Application de la méthode à l'évaluation du taux de relargables dans les solutions aqueuses pour perfusion à partir de poches en plastique.

La méthodologie proposée a aussi été appliquée sur des poches pour perfusion utilisées au niveau des hôpitaux. Deux types de poches de 500 mL ont été analysés, à savoir (i) des poches en PVC plastifié au DEHP et (ii) des multicouches (MCP) constituées de polypropylène (PP), polyamide (PA) et polyéthylène haute densité (PEHD) collées entre elles avec un adhésif, le polyuréthane (PU). Les MCP utilisées sont périmées et supposées exemptes de DEHP.

Pour les poches en PVC, deux lots ont été testés, un lot récemment fabriqué (PVCN) et un autre périmé (PVCP). Les poches périmées ont été récupérées d'une échantillothèque où celles-ci étaient conservées pendant une durée dépassant les trois ans dans les conditions réelles d'utilisation, conformément aux directives de l'ICH (Conférence internationale sur l'harmonisation) et aux exigences techniques relatives à l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage humain [138].

Les poches périmées en PVC ont été utilisées pour confirmer avec certitude l'origine ou la provenance des relargables à partir du conditionnement plastique après une longue durée de contact.

Quant aux poches en MCP, celles-ci ont été utilisées pour vérifier d'une part, l'absence de DEHP comme indiquée dans le dossier technique du fournisseur du matériau plastique et pour identifier d'autre part, les autres types de plastifiants présents, responsables de la souplesse et l'élasticité de ces dernières.

Pour chaque type d'échantillon, des extractions ont été effectuées sur 250 mL de solution pour perfusion. Trois essais sont réalisés pour valider les résultats.

L'analyse des échantillons a porté essentiellement sur la recherche de contaminants ciblés dans cette étude et en particulier le DEHP.

Aussi, une tentative d'identification d'autres composés détectés dans les solutions pour perfusion et susceptibles de provenir des poches plastiques a été effectuée grâce à la base de données X-Calibur.

7.2 Résultats et discussion.

7.2.1 Validation de la méthode d'analyse GC-MS.

La méthode GC-MS a permis d'identifier les composés recherchés grâce aux temps de rétention et aux spectres de masse, en utilisant trois ions par composé.

Les fragments d'ions identifiés pour le DEHP et les autres composés sont indiqués dans le Tableau 7.2 ainsi que les paramètres de validation de la méthode GC-MS proposée. Les fragments d'ions cités ont été rapportés précédemment [15,16,133] et ne seront pas discutés.

La Figure 7.1 représente le chromatogramme d'une solution standard à 0,3µg/mL où tous les composés étudiés sont correctement résolus.

Les résultats du Tableau 7.2 montrent que le système est linéaire dans la gamme de concentrations sélectionnées avec des coefficients de regression $> 0,98$. Les courbes d'étalonnage sont représentées par la Figure E.1 (Appendice E).

De même, les résultats du tableau 7.2 montre que répétabilité est satisfaisante (RSD $< 10\%$) pour la plupart des composés recherchés à l'exception du DEHA et du DEHP pour lesquels la variation atteint 13% et 15%, respectivement (les valeurs des surfaces correspondant à la répatabilité et reproductibilité sont reportées dans le Tableau E.1 (Appendice E)).

La reproductibilité présente une plus grande variabilité pour la plupart des composés analysés. Ceci est attribuée à l'efficacité de l'ionisation qui est progressivement affectée par les interférences potentielles et se répercutent tout au long d'une séquence GC-MS. Lorsque la variation atteint les 30%, la source d'ions est nettoyée pour une analyse ultérieure.

Dans cette étude, nous avons effectué plusieurs tests pour déterminer la contribution du blanc afin d'évaluer la sensibilité réelle de la méthode et ses performances globales tenant compte des contaminations externes.

En effet, la difficulté pour l'analyse des phtalates, en particulier le DEHP, est bien connue et elle est attribuée aux contaminations externes pouvant provenir de différentes sources telles que les réactifs, les opérateurs, les manipulations, l'environnement de laboratoire et l'appareillage lui-même [139].

Des contributions externes allant jusqu'à 5,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ont été rapportées dans le cas de produits alimentaires [140]. C'est pour cela que des précautions particulières sont proposées pour réduire ces contaminations telles que l'utilisation de solvants de haute qualité, correctement conservés et en petites quantités et l'utilisation d'une verrerie stérilisée (400°C pendant 4h ou 250°C pendant 10h) [20, 99, 139].

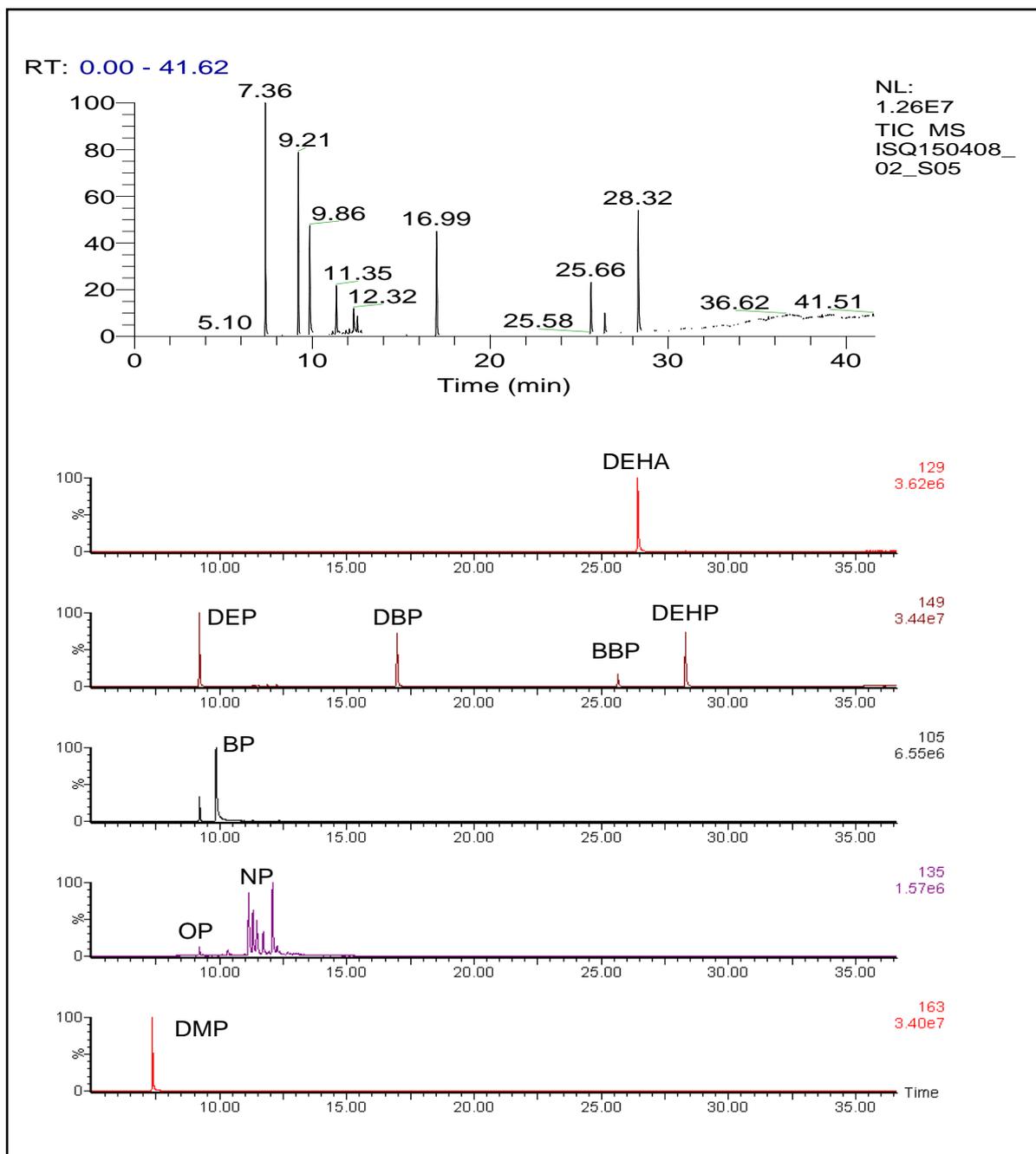


Figure 7.1: Chromatogramme d'une solution standard de plastifiants à 0,3 µg/L.

Dans notre étude, les LDM ont été déterminées pour chaque matrice examinée, en utilisant les 2 méthodes d'extraction SPE et LLE et en considérant la contribution moyenne des blancs de chaque composé provenant des solutions de NaCl et de glucose non chargées en contaminants (ces LDM sont plus réalistes et plus sûres).

Tableau 7.2: Résultats de la fiabilité de la méthode GC-MS pour l'analyse des additifs de matières plastiques.

Composé	Tr (min)	MM	Ions (m/z)	Equation de calibration	R ²	RSD % répétabilité	RSD % Reproducibilité
DMP	7,37	194,2	163, 77, 194	37878626 x - 297615	0,99	7,9	13,0
DEP	9,23	222,2	149, 177, 105	34567302 x - 814160	0,99	7,3	11,0
DBP	17,00	278,3	149, 150, 223	39139151 x - 40488	0,99	9,6	11,0
BBP	25,67	312,4	149, 91, 206	11598000 x - 555825	0,99	7,2	10,5
DEHP	28,33	390,6	149, 167, 279	28614383x - 1370859	0,98	14,8	28,6
DEHA	26,46	370,6	129, 112, 147	4385189 x - 179471	0,99	13,3	19,7
OP	9,34	206,3	135, 107	34093 x + 15597	0,99	5,2	9,1
NP	11,6 -12,1	220,4	135, 149, 107	6856372 x - 53597	0,99	8,3	14,6
BP	9,86	182,2	77, 105, 182	9303595 x - 330167	0,99	8,4	16,0

Il est facile de constater, d'après les résultats du Tableau 7.3 que les valeurs des LDM sont élevées pour la plupart des composés, ce qui permet de souligner encore une fois l'importance de les calculer en tenant compte de la contribution du blanc et qui sera différente dans chaque laboratoire.

Nous avons constaté que, pour la plupart des composés, les LDM observées sont plus élevées dans le cas des solutions de glucose et ceci peut être attribué à la qualité du réactif utilisé.

De même, les valeurs des LDM sont en général plus élevées avec la méthode LLE, ce qui peut être justifié par le fait que les opérations de manipulation dans ce cas sont plus ouvertes et exposées à l'environnement externe du laboratoire par rapport à la méthode SPE.

La LDM la plus élevée a été observée pour le DEP avec une valeur de 6,65 µg/L dans le milieu NaCl extrait par LLE, mais cette valeur a diminué avec la SPE.

Dans le cas particulier du DEHP, les LDM sont d'environ 0,19 et 0,7 µg/L dans les solutions de NaCl et de glucose, respectivement, avec la méthode SPE. Ces valeurs semblent très intéressantes quand elles sont comparées à celles rapportées par la littérature et qui sont de 10µg/L [15,141], 3µg/L [16], 0,5 µg/L [142] et 2,5µg/L [143].

Parmi les composés étudiés, le NP est le seul composé qui n'a pas été détecté dans les blancs, ainsi sa LDM a été calculée par la méthode classique du rapport (signal/bruit) multiplié par 3 en utilisant les solutions de NaCl et de glucose chargées à 1 µg/L (BC) et les résultats retrouvés sont inférieures à 0,03 µg/L. Ces valeurs restent très faibles par rapport à la limite fixée par la norme de qualité environnementale pour le NP et qui est de 0,3 µg/L selon la directive européenne 2008/105/CE [144].

Nous estimons que les résultats des différents paramètres évalués sont satisfaisants et que la méthode est fiable pour une application à l'analyse des relargables susceptibles de migrer de poches plastiques dans les sérums pour perfusion.

7.2.2 Vérification de l'efficacité des méthodes d'extraction des relargables.

L'efficacité des procédés d'extractions SPE et LLE a été évaluée sur des solutions aqueuses de NaCl à 0,9% et de glucose à 5% chargées en analytes à 1 µg/L (BC) et 10 µg/L (HC) par la détermination des rendements d'extraction et qui sont indiqués dans le Tableau 7.3.

Aux faibles concentrations BC (1 µg/L), les deux méthodes LLE et SPE n'ont pas été capables de récupérer certains composés à cause des interférences ou des contributions du blanc qui dépassaient le niveau de dopage.

Aux concentrations élevées HC (10 µg/L), les rendements d'extraction variaient selon la technique utilisée, LLE ou SPE, mais au sein d'une même méthode d'extraction, ils étaient similaires dans les deux milieux NaCl et glucose.

En effet, ces deux milieux sont aqueux et présentent des propriétés physiques similaires (un pH de 6 et une densité d'environ 1), ce qui n'a pas affecté l'extraction. Ceci est en accord avec ce qui a été rapporté par la bibliographie [145].

Dans le cas du DBP, nous avons obtenu des rendements élevés du fait d'une contamination externe et les interférences sont plus importantes dans le cas de la méthode LLE.

Dans le cas du DEHP, le phtalate le plus intéressant dans notre étude car c'est le seul plastifiant qui est autorisé dans les matériaux en PVC à usage parentéral, des rendements d'extraction acceptables ont été obtenus avec les deux méthodes LLE et SPE dans les deux milieux NaCl et glucose comparativement à ceux cités dans la littérature à savoir $92,2 \pm 7,8\%$ [15], 89 à $101 \pm 10\%$ [16] et $96 \pm 7,9\%$ [99].

Les RSD obtenus sur trois essais étaient plus faibles dans le cas de la méthode SPE, ce qui démontre sa meilleure reproductibilité attribuée principalement à une plus faible manipulation de l'échantillon et un contact avec l'environnement extérieur plus réduit (Figure E.2 du dispositif d'extraction dans l'appendice E).

En effet, dans le cas de la méthode LLE, en plus d'une grande exposition du système à l'environnement externe, l'utilisation de dichlorométhane comme solvant d'extraction, qui est fortement exothermique provoque des pertes après agitation et ouverture du robinet de l'ampoule à décanter. De plus, le trouble qui se forme entre les deux phases, organique et aqueuse, ne permet pas de faire une récupération totale de la phase organique et cet effet était plus prononcé dans le cas de la solution de glucose, ce qui augmente les erreurs de manipulation.

Au vu des résultats obtenus, les deux méthodes SPE et LLE sont aussi bien intéressantes que complémentaires et peuvent être proposées pour évaluer les phénomènes de migration des additifs de matières plastiques dans des solutions aqueuses pour perfusion. Cependant, pour l'analyse des relargables pour lesquelles, des concentrations très faibles sont attendues, la SPE serait plus appropriée car elle est plus précise et offre de meilleures performances.

En effet, la SPE est plus avantageuse, moins laborieuse et peut être appliquée directement et en une seule opération sur de grands volumes d'échantillons, permettant des pré-concentrations élevées et une détection de composés à l'état de traces possible. La LLE peut également être utilisée pour confirmer et valider les résultats.

Pour la suite de l'étude, nous avons utilisé uniquement la SPE pour la détermination des taux de relargables et la recherche du DEHP dans les solutions aqueuses pour perfusion en prenant de grandes précautions dans la manipulation des échantillons pour minimiser la contribution des blancs.

7.2.3 Application de la méthodologie aux essais de migration de plastifiants à partir de matières premières en PVC (granulé et films).

Les tests de migration permettent d'évaluer, dans des conditions contrôlées et souvent plus agressives que l'état réel, la quantité de composés pouvant migrer à partir de matière plastique.

Dans le cas de matériel médical et pour évaluer le risque d'exposition des patients perfusés aux plastifiants contenus dans les dispositifs médicaux en PVC, BERNARD et al. [146] proposent une méthode dynamique en utilisant un système fermé d'une tubulure en PVC plastifié (env. 2 L via 13 dm²) conservée à une température de 25°C pendant une durée de 24 h; la tubulure est remplie par un simulant à base d'éthanol et d'eau à 50/50 (v/v) pour se mettre dans les conditions les plus favorables à la migration et se rapprocher aussi des caractéristiques du sang humain.

Dans notre étude, l'eau a été choisie comme simulant le plus approprié du serum salé ou glucosé utilisé comme véhicule pour perfusion de produits pharmaceutiques dans les milieux hospitaliers.

Les résultats de migration sont reportés dans le Tableau E.2 (Appendice E) et représentés par la Figure 7.2.

La plupart des composés ont été identifiés dans les matières premières en PVC (film ou granulé), ceci confirme que la méthodologie proposée à savoir l'extraction par SPE et l'analyse par GC-MS est très appropriée pour mettre en évidence les phénomènes de relargage à partir de matières plastiques. Aussi les conditions adoptées, à savoir la stérilisation à l'autoclavage et l'utilisation de l'eau comme milieu de contact, simulent étroitement les conditions réelles de fabrication de poches ou matériel médical à usage parentéral.

Tableau 7.3 : Rendements d'extraction par LLE et SPE des relargables dans les solutions de NaCl et de glucose chargées à 1 µg/L (BC) et 10 µg/L (HC), n = 3.

Composés	Solutions de NaCl						Solutions de glucose					
	%R		MDL	%R		MDL	%R		MDL	%R		MDL
	LLE BC	LLE HC	µg/L	SPE BC	SPE HC	µg/L	LLE BC	LLE HC	µg/L	SPE BC	SPE HC	µg/L
DMP	108±12	110±4	0,35	80±10	78±6	0,27	16±5	62±27	0,31	19±3	88±20	0,43
DEP	n.d.*	85±6	6,65	102±14	112±16	0,85	n.d.	91±1	0,89	n.d.	79±15	3,13
OP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44±5	1,59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	93±29	1,65
BP	107±29	113±34	0,16	58±7	117±13	0,11	n.d.	107±48	1,0	n.d.	45±3	0,80
NP	73±1	107±13	0,03	87±7	113±7	0,015	86±14	129±9	0,03	85±26	77±10	0,02
DBP	112±8	170±39	0,36	110±15	152±13	0,26	n.d.	197±20	2,38	148±19	159±13	0,94
BBP	n.d.	n.d.	n.d.	100±34	65±6	0,04	n.d.	82±7	0,99	n.d.	43±5	1,05
DEHA	112±28	111±7	0,27	62±12	56±1	0,88	n.d.	131±10	2,34	n.d.	86±14	3,31
DEHP	Int**	86±17	2,16	109±15	72±4	0,19	int	int	int	97±2	70±4	0,7

* n.d. = non détecté.

**int. = interférences externes.

Nous remarquons que les résultats des taux du DEHP étaient les plus élevés. Ceci est justifié par le fait que c'est le seul plastifiant qui est autorisé officiellement dans le PVC plastifié à usage parentéral.

Aussi, les niveaux détectés sont plus importants dans le cas du granulé (5461 ± 844 $\mu\text{g}/\text{kg}$) par rapport au film ($38,7 \pm 6$ $\mu\text{g}/\text{kg}$) (les chromatogrammes sont représentés par la Figure 7.3) et reflète la différence dans la composition des deux matériaux analysés.

En effet, le film et le granulé sont utilisés respectivement dans la fabrication de poches et de tubulures. La tubulure étant plus flexible, elle nécessite systématiquement plus de plastifiant, de plus, elle est stérilisée vide (aucun contact avec le solvant), ce qui diminue le risque de migration par rapport à la poche qui, elle est stérilisée une fois remplie de sérum. D'un autre côté, la forme sphérique du granulé peut aussi être un facteur favorable à la diffusion du plastifiant. En effet, ces derniers se dispersent totalement lorsqu'ils sont mis en contact avec l'eau contrairement aux films (coupés en pièces de 2×2 cm^2) qui s'adhèrent et se collent entre eux, diminuant ainsi le contact surface/milieu.

Tous ces facteurs peuvent justifier cette grande différence entre les taux de DEHP détectés dans les deux types de matériaux.

Il n'y a pas de législation concernant les niveaux maximums de migration dans les produits pharmaceutiques ou les dispositifs médicaux. Toutefois et à des fins de comparaison, les niveaux retrouvés ont été comparés au règlement 10/2011/CE de la Commission Européenne [7] relatif aux études de migration dans le domaine alimentaire.

La limite de migration spécifique (LMS) du DEHP qui a été évaluée pour ses risques pour la santé humaine conformément au règlement 793/93/CEE de la Commission Européenne [147] et aux restrictions d'utilisation prévues dans la directive 76/769/CEE [22] est de 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'aliment ou de simulant d'aliment.

Cette limite reste supérieure aux niveaux de DEHP retrouvés dans nos échantillons quand ils sont rapportés à 1L (1kg) d'eau représentant la denrée alimentaire et qui sont d'environ 82,0 µg/Kg et 0,6µg/Kg, respectivement pour le granulé et le film. Mais cette comparaison n'est pas justifiée par rapport à la voie d'administration qui est beaucoup plus risquée dans le cas d'une perfusion intraveineuse.

En ce qui concerne les autres phtalates, leurs niveaux de migration restent faibles mais non négligeables, ce qui confirme que les matières premières utilisées ne sont pas plastifiées uniquement au DEHP.

En effet, le DBP peut être utilisé comme plastifiant de polymères industriels dans les matériaux recyclés ou dans les emballages mis en contact avec les aliments non gras selon l'Agence Européenne des Produits Chimiques [148]. Il peut se retrouver comme agent de support technique dans les polyoléfines à des concentrations allant jusqu'à 0,05%. Sa LMS est de 300 µg/kg de denrée alimentaire.

Quant au DEP, c'est un plastifiant de matières plastiques qui ne figure pas dans le règlement 10/2011/CE [7].

Enfin, le DEHA est inclus dans la liste des plastifiants alternatifs au DEHP [149]. Il est utilisé dans une grande variété d'emballages plastiques, en particulier lorsqu'une flexibilité est requise à basse température [150].

De même, l'étude de migration réalisée par BERNARD et al. [146] sur des tubulures en PVC a démontré la présence de plusieurs plastifiants mais le DEHP était celui qui présentait la capacité de migration la plus élevée en fonction du temps de contact avec un taux équivalent à $347,1 \pm 29,1$ µg/mL.

Les benzophénones sont des diphénylcétones non substituées utilisées comme stabilisants de matières plastiques contre les rayons UV pour empêcher la décoloration, ainsi que les fissures et la perte de propriétés physiques dues au soleil [151]. Elles sont utilisées comme additifs ou auxiliaires de production de polymère et comme catalyseur photo amorceur pour les encres et laques durcies à la lumière UV [152].

Les résultats du Tableau E.2 (Appendice E) montrent que la BP peut migrer à partir du matériau en PVC, film et granulé (environ $32,8 \pm 1,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ et $26,4 \pm 5,8 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivement), mais son utilité comme additif dans ce type de matériaux (usage parentéral) n'est pas justifiée.

La présence de la BP a aussi été rapportée dans une étude réalisée sur des solutions pour perfusion en NaCl et glucose contenues dans des poches en plastique [153] malgré que cette dernière soit associée à une activité endocrinienne, cancérigène et allergisante [154, 155].

Quant aux BBP, OP et NP, ces derniers n'ont été détectés dans aucun des échantillons, ce qui indique que ces composés ne sont pas utilisés comme additifs du PVC à usage parentéral.

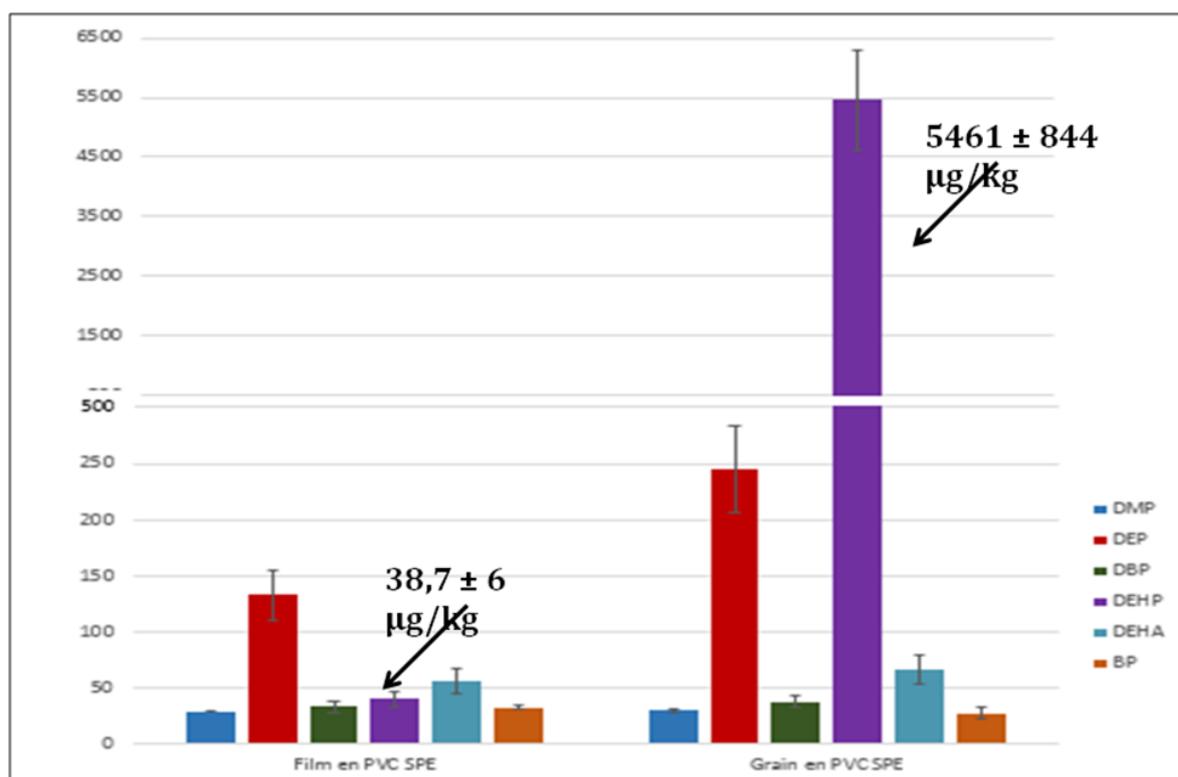


Figure 7.2 : Taux de migration de différents contaminants ($\mu\text{g}/\text{kg}$) à partir de MP en PVC (granulé et film) après stérilisation à 121°C pendant 20min par SPE (n=3).

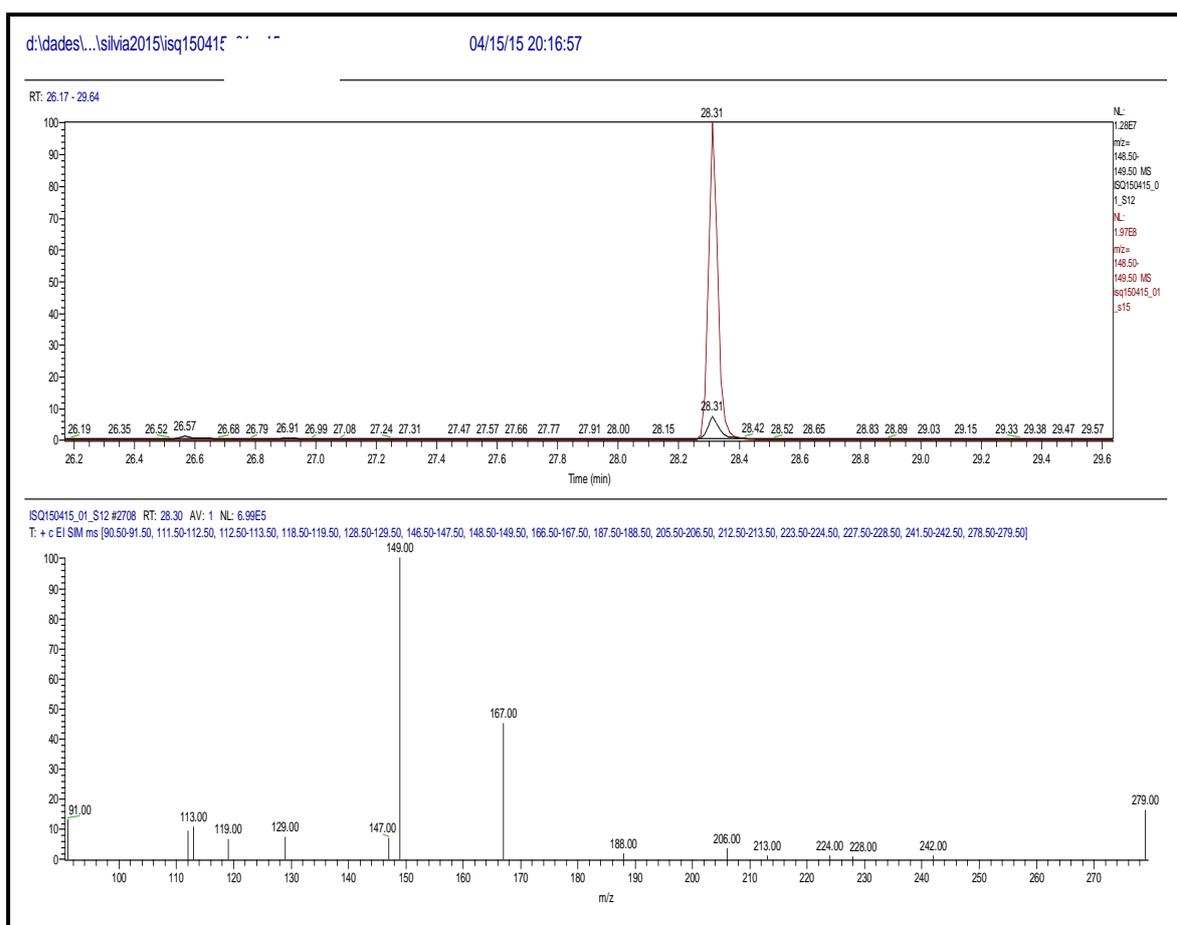


Figure 7.3: Chromatogrammes et spectre de masse du DEHP ($m/z = 149$) dans le granulé et le film (stérilisation à l'autoclave, extraction SPE).

7.2.4 Application de la méthodologie à l'évaluation du taux de relargables dans les solutions aqueuses pour perfusion à partir de poches en plastique.

Les résultats des taux de relargables retrouvés dans les solutions aqueuses pour perfusion de NaCl et de glucose conditionnées dans les poches en PVC nouveau (PVCN), en PVC périmé (PVCP) et en multicouches périmées (MCP) après extraction par la méthode SPE sont indiqués dans le Tableau E.3 (Appendice E) et représentés par les Figures 7.4 , 7.5 et la Figure E.3 (Appendice E).

Parmi les composés recherchés, seul le DEHP est détecté dans les poches en PVC alors que dans la MLP, ce sont le DEP et le DBP qui ont été identifiés.

Les résultats montrent une fois de plus que les deux milieux aqueux en NaCl et en glucose n'influent pas sur la migration des relargables.

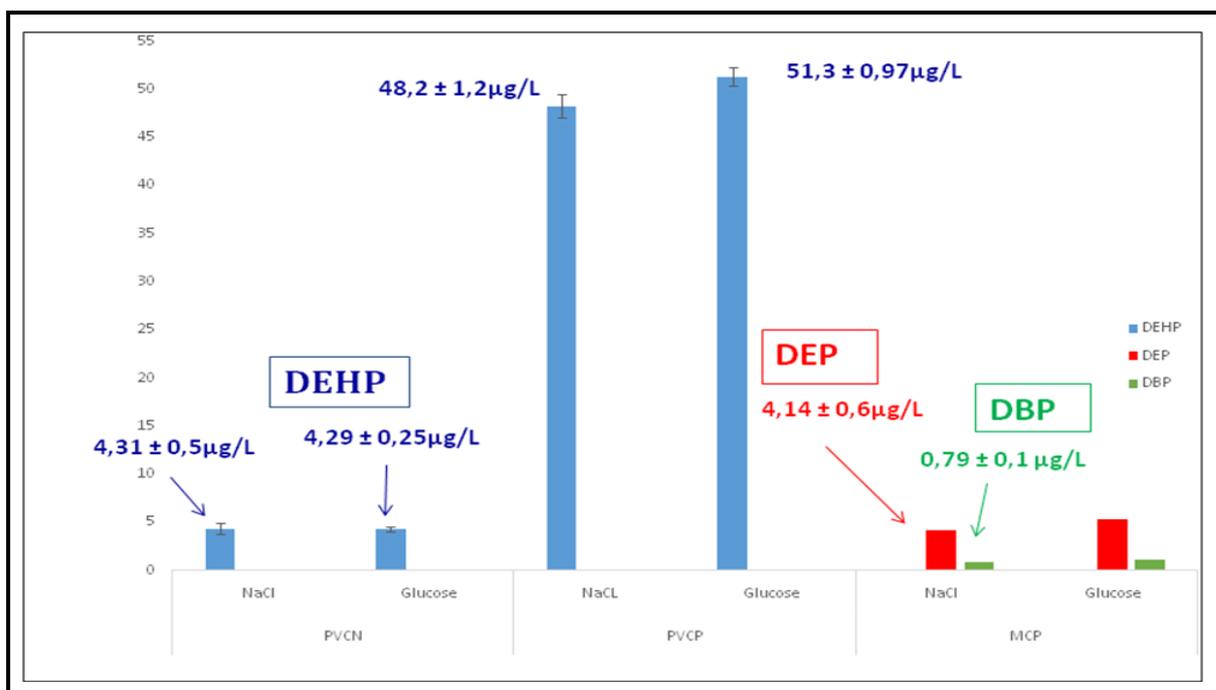


Figure 7.4 : Taux en ($\mu\text{g/L}$) de plastifiants retrouvés dans les solutions pour perfusion conditionnées dans les poches en PVCP, PVCN et en MCP.

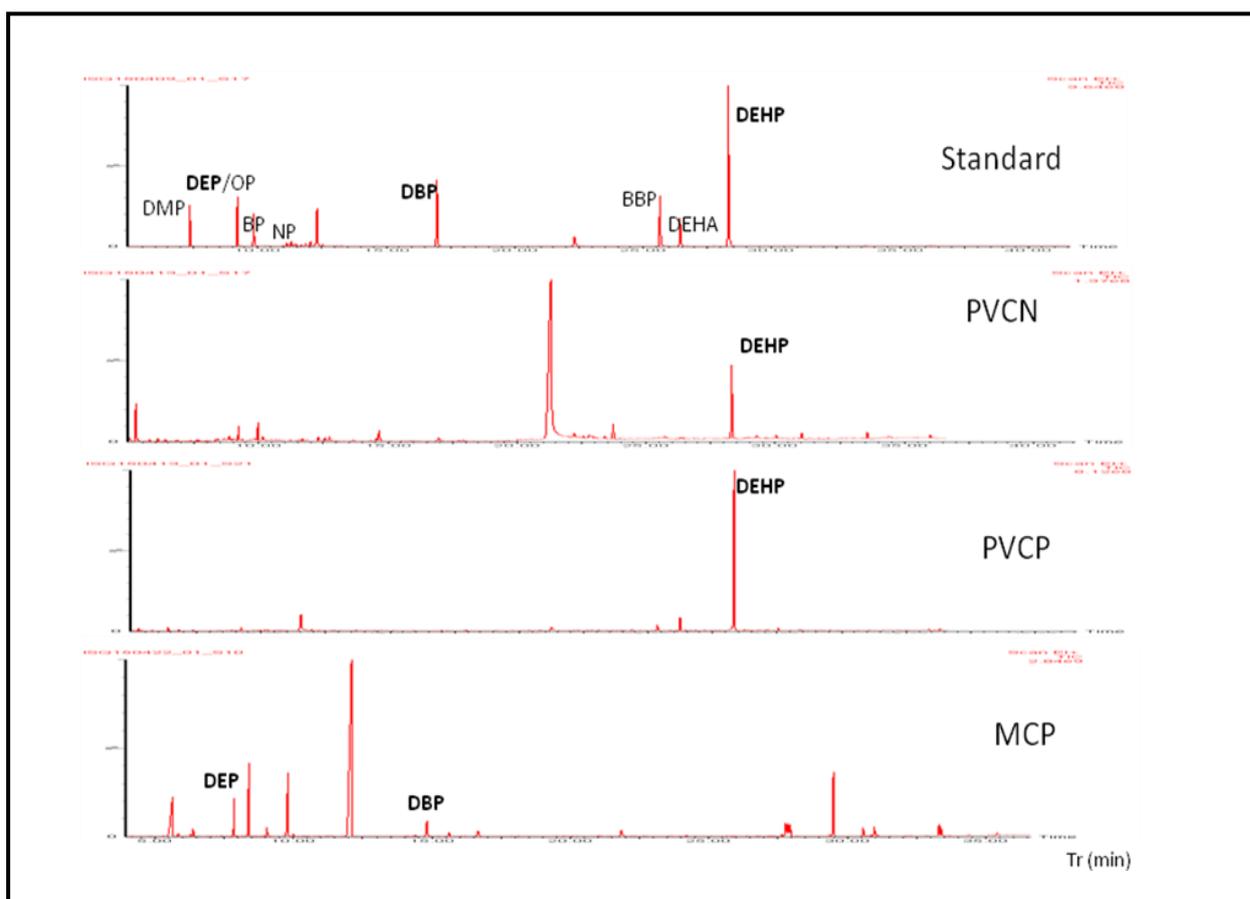


Figure 7.5 : Chromatogrammes des plastifiants retrouvés dans les solutions de NaCl conditionnées dans les poches en PVCN, en PVCP et en MCP avec une solution standard à $10 \mu\text{g/L}$ après extraction par SPE.

En plus des phtalates DEHP, DEP et DBP, d'autres pics étaient présents dans les chromatogrammes des échantillons. Une tentative d'identification a été effectuée par comparaison des spectres de masse obtenus avec ceux de la librairie X-Calibur.

Les résultats des identifications sont reportés dans le Tableau 7.4 et représentés par les Figures 7.6, 7.7 et 7.8 et la Figure E.4 (en Appendice E).

Nombreuses sont les études qui ont démontré la migration du DEHP à partir de lignes pour dialyse ou tubulures en PVC plastifié mais uniquement dans les milieux à caractère lipophile comme le sang, le plasma, émulsions lipidiques ou solutions intraveineuses qui contiennent des anticoagulants ou tensioactifs [15, 156-158].

Quant au milieu purement hydrophile comme les solutions aqueuses pour perfusion, la migration du DEHP a souvent été considérée négligeable ou nulle, justifiée par sa faible solubilité dans l'eau (Fiche DEMETER 015 2010) [145, 153].

Paradoxalement, dans le domaine agroalimentaire, le DEHP a été détecté dans l'eau minérale et les boissons aqueuses mais à des taux très variables d'une étude à l'autre ceci pouvant être lié à la nature du matériau plastique, les conditions de stockage, les méthodes d'analyse et d'extraction ainsi qu'aux contaminations externes [5, 93, 137, 159- 161].

Dans notre étude, le DEHP a pu être détecté dans les sérums salé et glucosé (milieu aqueux) conditionnés dans le PVCN à des taux de $4,31 \pm 0,5$ et de $4,29 \pm 0,25$ $\mu\text{g/L}$, respectivement grâce à la bonne sensibilité de la méthode GC-MS et surtout à l'efficacité du processus d'extraction SPE qui permet une bonne pré-concentration de l'échantillon.

Tableau 7.4 : Composés identifiés dans les solutions pour perfusion conditionnées dans les poches en PVC et en MCP (librairie X-Calibur)..

Cas du PVC			Cas de la MCP		
Tr min	Fragments	Composé (probabilité %)	Tr min	Fragments	Composé (probabilité %)
4,62	73, 88, 101, 116, 129	Acide 2-Ethyl-hexanoïque (92%)	14,39 14,82 32,69 35,84	149, 167, 223 104,149, 193 104, 149, 193, 208 104, 149, 193	Des dérivés de l'acide phtalique (67%)
8,86	100, 101, 83	2-éthyl 1-hexanol (50%)	8,36	129, 111, 101, 83	Un dérivé de l'acide adipique (5%)
11,33	91,106, 120, 196	Dibenzylamine (92%)	5,61	113, 85, 84	Caprolactame (86%)
20,95	149, 167, 112, 70	Monophtalate de (2-éthyl-hexyle) (52%)	7,84	191, 206	2,4-bis(1,1-diméthyléthyl) phenol (57%)
23,47	112, 100, 113, 211, 83	Acide butènedioïque, bis (2-éthylhexyl) ester (52%)			

Dans le cas des poches en PVCP, les taux de DEHP retrouvés sont de $48,2 \pm 1,2$ et $51,3 \pm 0,97$ $\mu\text{g/L}$ dans les solutions saline et glucosée, respectivement, ce qui représente environ 10 fois la concentration détectée dans les poches en PVCN; ceci confirme avec certitude la provenance de ce plastifiant à partir du matériau plastique et sa capacité de migration même dans un milieu purement hydrophile.

Aussi ce résultat reflète l'intérêt à accorder aux conditions de stockage pour diminuer les risques de migration de plastifiants à partir de conditionnement plastique vers le contenu [93].

Dans une étude similaire, un taux de $3,72$ $\mu\text{g/L}$ de DEHP a été détecté par GC-MS dans des solutions salines pour perfusion conservées dans des poches périmées en PVC plastifié. Cette valeur, plus faible que celle retrouvée dans notre étude peut être attribuée au procédé d'extraction utilisé (procédé LLE avec l'hexane comme solvant d'extraction) [106].

Il est important de signaler que la poche en PVC plastifié est considérée conforme et utilisable tant qu'elle n'a pas dépassé le délai de péremption (3ans). Par conséquent et en majorant, si avec un taux de DEHP proche de $50\mu\text{g/L}$ (moyennant 2 à 4 poches par jour pour un malade hospitalisé pour une durée de 2 à 4 jours), le taux peut atteindre facilement les 400 μg .

Si, à cette valeur s'ajoute le DEHP provenant des autres éléments de la ligne de dialyse comme la tubulure et les contaminations externes, la quantité finale ne sera plus négligeable et sera même préoccupante surtout avec le risque lié à la voie d'administration parentérale.

Ce phtalate reste toujours autorisé à 40% (m/m) dans le PVC plastifié destiné à cette voie d'administration selon les exigences de la Ph. Eu. en vigueur, bien que sa migration dans le contenu soit démontrée et ce, quelle que soit sa nature (lipophile ou hydrophile) et qu'elle augmente avec la durée de contact (conservation).

Dans le cas de la multicouche périmée MCP, le DEHP n'a pas été détecté ; ce matériau, composé par trois couches en PP, PA et PEHD (collées entre elles avec un adhésif en PU) a été utilisé comme alternatif au PVC plastifié pour éviter la migration du DEHP.

En revanche, deux autres plastifiants, DEP et DBP ont été détectés dans la solution de perfusion en NaCl à des taux de $4,14 \pm 0,6$ et $0,79 \pm 0,1$ $\mu\text{g/L}$, respectivement. Ces plastifiants ne sont pas autorisés par la Ph. Eu. [162, 163], seul le PU (qui n'est pas monographié dans la pharmacopée) pourrait être la source de ces deux phtalates [164].

Même si le taux global de phtalates qui a diffusé à partir de la MCP reste faible comparativement à celui du DEHP provenant du PVCP, cela constitue une non-conformité par rapport à la réglementation qui n'autorise pas leur utilisation dans ce type de matériau. De plus, le DBP est classé dans la même catégorie que le DEHP et ne peut être utilisé comme alternatif de ce dernier [22].

La migration de phtalates comme le DEHP, le DEP et le DBP a été mise en évidence dans les cas de conditionnements en PVC déclaré sans phtalates par les fabricants [153, 165], de matériaux co-extrudés [17] ou de multicouches [166] utilisés dans la fabrication du matériel médical.

Finalement, ces matériaux proposés comme alternatifs au PVC plastifié n'offrent pas plus d'inertie et de sécurité que ce dernier et les données cliniques sont nécessaires pour estimer l'exposition réelle des patients au DEHP ou à ses alternatifs à partir de dispositifs médicaux [166].

Plusieurs auteurs ont pu mettre en évidence, en plus de la migration des phtalates, la présence de produits de dégradation de ces derniers et en particulier ceux du DEHP. En effet, l'hydrolyse des phtalates permet d'obtenir des mono-esters comme le mono phtalate de (2-éthylhexyle) MEHP dans le cas du DEHP et l'alcool 2-éthylhexanol (2-HE). Le mono-ester se convertit en acide phtalique alors que l'alcool 2-éthylhexanol s'oxyde pour donner de l'acide 2-éthylhexanoïque (2-EHA) [167-171].

Dans le cas du PVC, nous avons pu mettre en évidence la présence du monophtalate de (2-éthylhexyle), de l'acide 2-éthylhexanoïque ainsi que le 2-éthyl-1-hexanol confirmant ainsi la présence du DEHP (Tableau 7.4 et Figure 7.6).

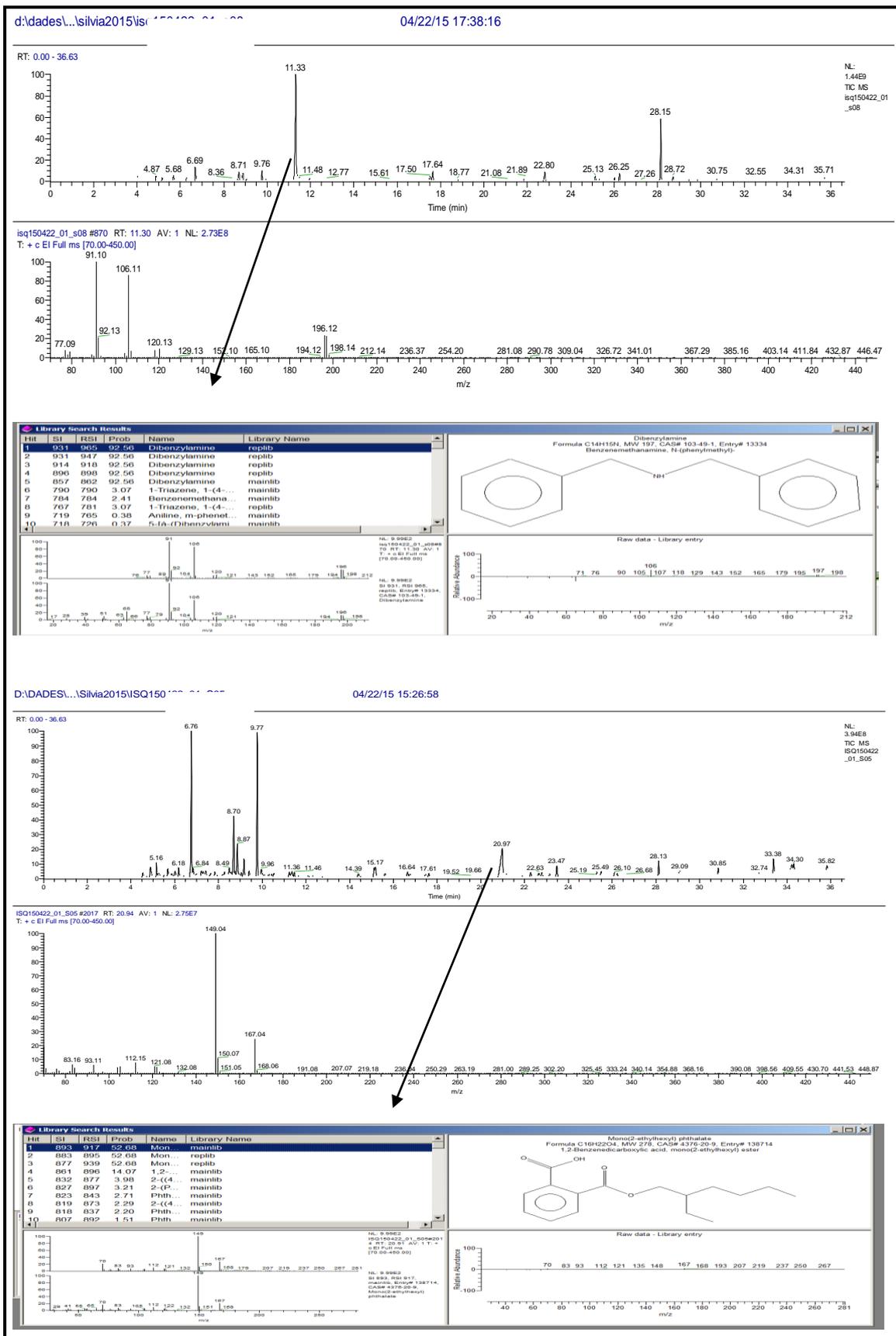


Figure 7.6: Scan de la solution de perfusion conditionnée dans le PVCP

Dans le cas de la MCP, ce sont des dérivés de l'acide phtalique (Figure 7.7) qui ont été détectés, confirmant la présence de phtalates dans cette dernière aussi.

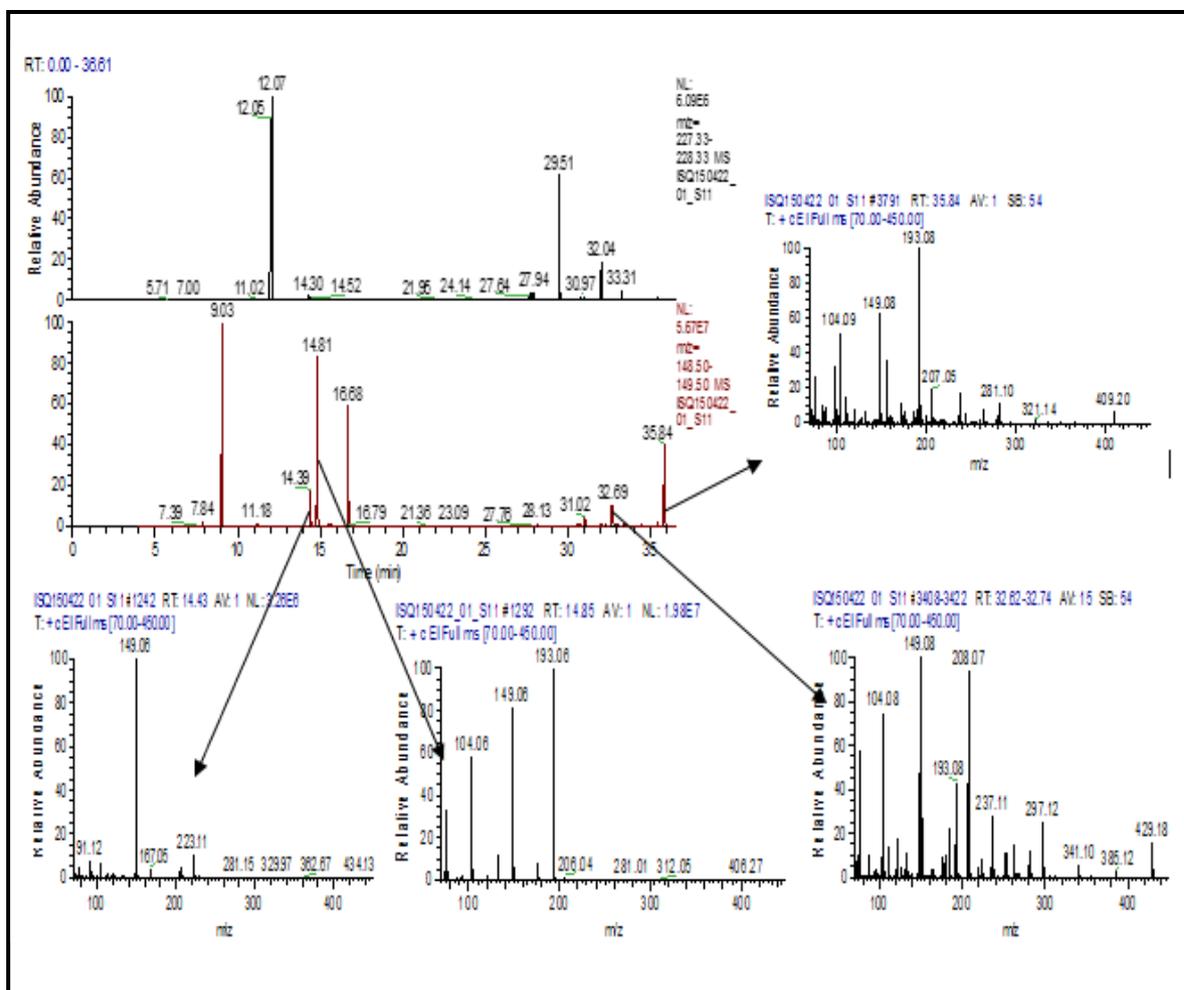


Figure 7.7 : Scan de la solution pour perfusion conditionnée dans la MCP (mode TIC à $M/z=149$ pour les phtalates).

Quant aux antioxydants utilisés comme stabilisants de matières plastiques, leur hydrolyse à haute température permet d'obtenir des sous-produits qui jouent eux-mêmes le même rôle [172-178]. Il s'agit d'un mélange de phénols, de phosphites et d'acide phosphorique.

Dans la MCP, nous avons pu mettre en évidence la présence du 2,4-bis (1,1-diméthyl-éthyl) phénol [174] qui est un produit de dégradation de l'Irgafos 168, un antioxydant autorisé par la Ph. Eu. dans les polyoléfines comme le PE qui constitue la couche interne de la MLP (Tableau 7.4, Figure 7.8 et Figure E.4 (Appendice E)).

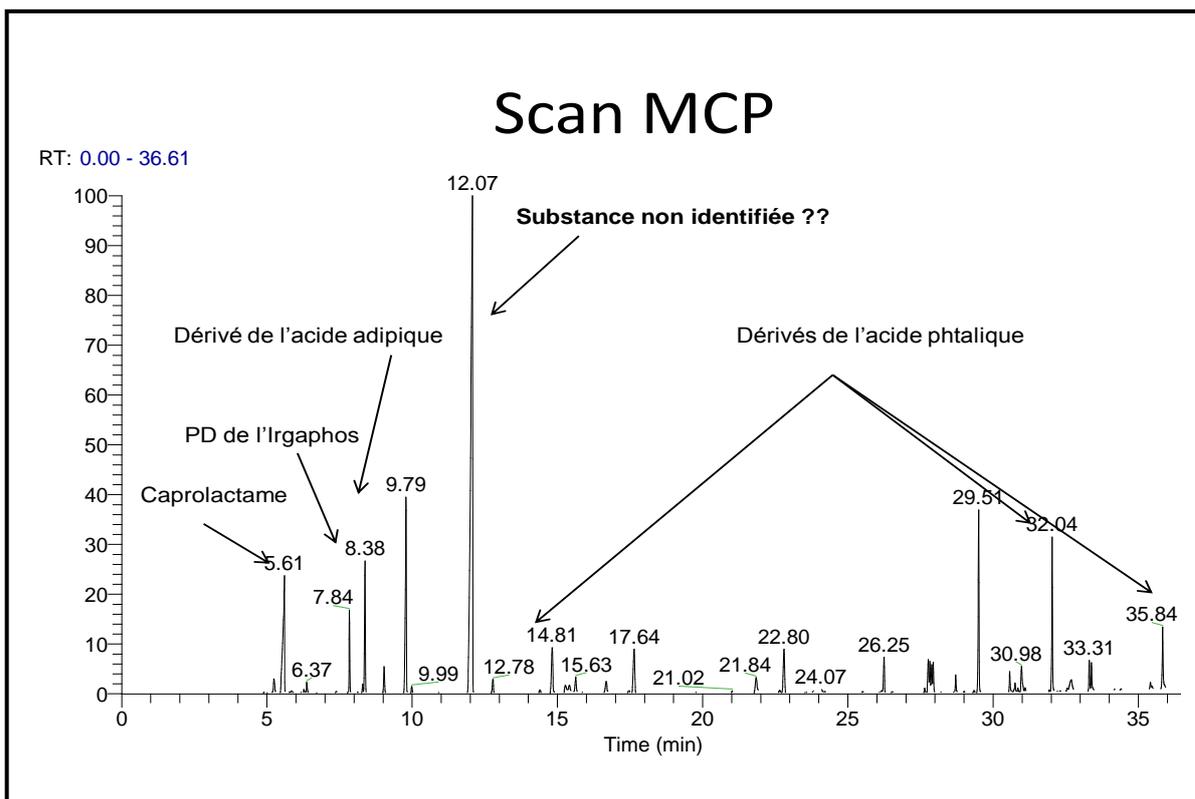


Figure 7.8 : Scan de la solution pour perfusion conditionnée dans la MCP (pics non identifiés).

Le Caprolactame a aussi été identifié dans le cas de la MCP (Figure 7.8). C'est le monomère du polyamide 6 (nylon 6) et ne peut provenir que de la couche intermédiaire du matériau [179]. Ce composé a aussi été détecté dans des solutions intraveineuses stockées dans des poches en multicouches et même dans des poches en PVC protégées par une enveloppe protectrice en tri-laminée.

Finalement, le caprolactame peut migrer à travers plusieurs couches de matériaux pour contaminer les solutions pour perfusion [38, 172, 180].

La dibenzylamine a été identifiée dans les solutions pour perfusion conditionnées dans du PVC (Figure E.4 Appendice E). C'est un composé qui peut être utilisé comme accélérateur de réaction de polymérisation mais son utilisation dans le PVC n'est pas justifiée, d'autant plus que les données toxicologiques ne sont pas définies [181].

D'autres pics ont été détectés mais les produits correspondants n'ont pas pu être identifiés dans la librairie X-Calibur comme c'est le cas du pic intense à 12,07min dans la poche MCP (Figure 7.8).

Ces pics peuvent correspondre à des impuretés provenant de l'environnement, aux détergents utilisés lors des nettoyages du matériel de fabrication ou aux produits de dégradation. Ils sont désignés par NIAS (NIAS = substances not intentionally added) [5, 182, 183].

Alors que dans le domaine agroalimentaire, les niveaux de migration et d'exposition (niveau maximum d'absorption journalière) sont bien établis [7,184], ces informations manquent dans le domaine pharmaceutique. L'exposition et les risques potentiels du DEHP et des autres additifs de matières plastiques par transfusion n'ont pas été complètement évalués.

7.3 Conclusion.

Dans cette étude est décrite la méthodologie à adopter pour le suivi des phénomènes de migration de relargables à partir de poches en matières plastiques dans des solutions aqueuses pour perfusion de NaCl et de glucose utilisées comme véhicule de médicaments.

Il est important d'effectuer une vérification de tous les éléments clés de la procédure proposée se rapportant à la fiabilité de la méthode d'analyse GC-MS, l'efficacité des procédés d'extraction et surtout à la contribution des contaminations externes (dans le cas de composés omniprésents comme les phtalates).

De nouvelles informations sont fournies sur les niveaux de migration de divers plastifiants, en particulier le DEHP, à partir de matériaux en PVC dans des solutions aqueuses. En effet, l'étude, réalisée sur la matière première en PVC utilisée dans la fabrication de dispositifs médicaux a révélé la présence de plusieurs plastifiants dont le DEHP qui reste majoritaire avec des taux qui dépassent les 5000 µg/kg de matière plastique et ce, dans des conditions similaires à celles utilisées dans la fabrication de ces derniers (stérilisation à l'autoclave à 121 °C pendant 20 min).

Aussi, l'étude a confirmé la migration du DEHP à partir de poches en PVC plastifié dans les solutions de perfusion aqueuses salines et glucosées; en effet, des taux d'environ 5µg/L ont été détectés dans des poches en PVCN et cette teneur a augmenté de plus de 10 fois dans les poches en PVCP.

Dans la MCP utilisée comme alternative au PVC plastifié, le DEHP n'a pas été détecté mais d'autres phtalates, à savoir la DEP et la DBP, ont été détectés à des taux de 4,14 et 0,7 µg/L, malgré qu'ils ne sont ni autorisés par la pharmacopée ni mentionnés dans le dossier technique du fournisseur, ce qui ne diminue en rien des phénomènes de relargage.

En plus des plastifiants détectés, d'autres composés ont pu être mis en évidence grâce à la librairie X-Calibur dans les solutions pour perfusion (provenant de réactions de dégradation, d'hydrolyse, d'oxydation ou autres additifs de matières plastiques). L'origine de ces composés peut être attribuée aux phénomènes de migration à partir du conditionnement plastique même dans le cas d'utilisation du PEHD (couche interne de la MCP) qui est favorisée pour son inertie.

La présence de ces contaminants montre que les exigences concernant la qualité des matières plastiques utilisées dans le conditionnement pharmaceutique ne sont pas entièrement respectées même dans le cas d'une utilisation parentérale.

Au vu de cette synthèse, nous pouvons affirmer que les résultats des taux de contaminants observés dans les sérums de NaCl ou de glucose indiquent que la transfusion peut être une source de phtalates chez l'homme et que ces taux peuvent représenter un risque potentiel pour les patients recevant des transfusions surtout réitératives. Le risque de contamination étant assez élevé pour l'homme, nous mettons en garde la dangerosité de ces produits à des fins thérapeutiques pour ce type de patients.

CONCLUSION GENERALE

Une contribution aux études d'interaction contenu-contenant a fait l'objet de cette étude et a porté principalement sur le conditionnement en PVC pour forme sèche (comprimé) et pour solutions aqueuses pour perfusion (sérum salé et glucosé).

Dans le cas du contrôle qualité, une méthode d'extraction par dissolution-précipitation (THF/ éthanol) et des méthodes d'analyse fiables par spectrométrie UV et par chromatographie HPLC sont proposées pour l'analyse du DEHP dans le PVC plastifié à usage parentéral. Leur application pour l'analyse du DEHP dans la matière première (granulé) et la poche en PVC plastifié a donné des résultats conformes aux normes fixées par la pharmacopée européenne. Cette procédure, optimisée et validée, a aussi été appliquée au nouveau lot de matière première en PVC plastifié déclaré sans phtalates et destiné aux services de pédiatrie, de néonatalogie et de maternité.

Les résultats très satisfaisants obtenus ont démontré d'une part l'absence du DEHP et, d'autre part, la possibilité d'adopter cette même méthodologie pour l'analyse du plastifiant alternatif du DEHP dans le nouveau matériau en PVC sous réserve de disposer d'un standard.

L'analyse par GC-MS quant à elle, a confirmé l'absence du DEHP dans le nouveau matériau et a permis d'identifier le plastifiant alternatif comme étant un mélange d'acide oléique et d'oléate d'éthyle provenant d'acides gras utilisés comme bioplastifiants dans les polymères plastiques. L'utilisation de ces substances naturelles comme plastifiants du PVC est très rassurante pour répondre aux exigences de la qualité et surtout de la sécurité des dispositifs médicaux mis sur le marché.

Les phénomènes d'interaction contenu-contenant sont évalués sur le contenant (par le suivi des variations qui se produisent dans le conditionnement plastique) grâce la spectrométrie FTIR ou bien, sur le contenu (par la détermination des relargables dans la forme pharmaceutique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS).

La spectrométrie FTIR a été appliquée dans le cas d'une forme « comprimé » conditionnée dans des blisters en PVC. Les variations observées dans les spectres obtenus en fonction du temps de contact (> 3 ans) ont été attribuées à d'éventuels phénomènes de sorption ou de relargage entre le couple (contenu/contenant). Cette approche méthodologique est très intéressante car elle peut être adoptée lors des études de stabilité par le suivi simultané des spécifications de la forme pharmaceutique (contenu) et des évolutions qui se produisent dans le matériau de conditionnement plastique (contenant) par FTIR. Cette méthode simple et de mise en œuvre facile (application directe sur le matériau) peut révéler d'éventuels échanges entre le produit et son conditionnement.

En ce qui concerne la recherche des relargables dans le contenu, l'utilisation de techniques très performantes est nécessaire. Dans cette étude, la recherche des migrants s'est limitée à une série d'additifs dont les plastifiants et en particulier le DEHP, dans les solutions aqueuses pour perfusion de NaCl 0,9% et de glucose 5% (milieu purement hydrophile) conditionnées dans des poches plastiques en PVC plastifié et en multicouches. La fiabilité de la méthode d'analyse GC-MS utilisée et l'efficacité du procédé d'extraction SPE proposé ont été vérifiées en tenant compte de la contribution des contaminations externes (omniprésence des substances recherchées).

Des taux de DEHP équivalents à 5µg/L ont été détectés dans les solutions pour perfusion conditionnées dans du PVCN (nouveau lot) alors qu'il a augmenté de plus de 10 fois (> 50µg/L) dans le cas de poches en PVCP (périmées), ceci confirme sa provenance ou sa migration à partir du matériau plastique.

Dans le cas de la multicouche MCP, utilisée comme alternative au PVC plastifié (pour éviter le problème des phtalates), le DEHP n'a pas été identifié, en l'occurrence, deux plastifiants, à savoir la DEP et la DBP ont été détectés à des taux de 4,14 et 0,7 µg/L. Ces phtalates ne sont pas autorisés par la pharmacopée dans ce type de matériau et le DBP est classé dans la même catégorie que le DEHP.

Grâce aux performances du logiciel X-Calibur, d'autres composés ont pu être identifiés dans le sérum comme le produit de dégradation de l'Irgaphos (antioxydant utilisé dans les polyoléfines), des produits d'hydrolyse et d'oxydation du DEHP et le caprolactame (monomère du polyamide).

L'origine de ces composés ne peut être attribuée qu'aux phénomènes de migration à partir du conditionnement plastique que ce soit en PVC ou en MCP.

La présence de ces contaminants démontre clairement le non respect des exigences concernant la qualité des matières plastiques utilisées dans le conditionnement pharmaceutique surtout à usage parentéral (voie d'administration la plus critique) et les taux des phtalates observés même dans un milieu hydrophyle (cas du serum salé ou glucosé) peuvent représenter un risque potentiel pour les patients recevant des transfusions surtout répétitives.

Alors que dans le domaine alimentaire, les niveaux de migration, l'exposition et l'évaluation de l'ingestion journalière totale et les concentrations maximales sont bien établies, ces informations manquent dans le cas de produits pharmaceutiques.

En effet, l'exposition et les risques potentiels du DEHP et d'autres additifs plastiques par transfusion n'ont pas été complètement évalués.

Pour ce, des dispositions réglementaires plus rigoureuses et harmonisées concernant la pureté et la composition des matériaux utilisés dans le conditionnement pharmaceutique doivent être prises afin d'assurer un haut niveau de protection de la santé et de l'environnement.

Il ressort de la synthèse de cette recherche que l'évaluation de la relation contenu-contenant peut être plus aisée par une meilleure connaissance du conditionnement couplée à celle du médicament; en effet, l'échange d'informations entre les deux parties directement impliquées (industriel pharmaceutique/ producteur de conditionnement) par le biais de contrat définissant les aspects confidentialité et informations protégées serait la solution pour pallier aux problèmes des interactions contenu-contenu et permettrait de définir les choix du matériau lors de la phase du développement pharmaceutique.

En perspectives à cette étude, il serait intéressant de :

- Valider la méthode d'analyse du DEHP et du plastifiant alternatif dans le nouveau lot de PVC selon les exigences définies dans le dossier d'enregistrement AMM et son utilisation dans les contrôles de routine après acquisition des substances de référence ;
- Approfondir la recherche bibliographique sur les bio-plastifiants, leurs effets toxicologiques et leur migration éventuelle,
- Vérifier la méthodologie proposée pour le suivi des interactions C/C par FTIR dans le cas d'une forme liquide dans laquelle les échanges sont généralement plus importants (ex. poches plastique pour perfusion),
- Appliquer la spectrométrie FTIR pour évaluer la compatibilité du PVC plastifié au plastifiant alternatif du DEHP (utilisé dans les DM) avec des milieux lipophiles (cas des émulsions utilisées en perfusion) par le suivi des bandes spécifiques de ce dernier en fonction du temps de contact.
- Compléter l'identification par GC-MS des composés relargués dans les sérums salé et glucosé surtout dans le cas du pic intense observé dans la MCP (multicouche), évaluer leurs teneurs en utilisant des substances de références et les comparer aux exigences réglementaires.

APPENDICE A

LISTE DES ABREVIATIONS.

A :	Absorbance
ANSM :	Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ANSES :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATR :	Spectrométrie à réflexion totale atténuée
BBP :	Phtalate de butyle et benzyle
BC :	Basse concentration
BP :	Benzophénone
C/C :	Contenu/contenant
°C :	Degré Celsius
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CE:	Commission Européenne
CE JRC:	Institut of health and consumer protection toxicology and chemical substance.
CERHR :	Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction.
GC-MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
CV :	Coefficient de variation
DBP :	Phtalate de di-n-butyle
DEHA :	Adipate de di- (2-éthylhexyle)
DEHP :	Phtalate de di (2-éthylhexyle)
DEP :	Phtalate de diéthyle
DIDP :	Phtalate de diisodécyle
DINP :	Phtalate de diisononyle
DM :	Dispositif médical

DMP :	Phtalate de diméthyle
DNOP :	Phtalate de di-n- Octyle
DPHP :	Phtalate de di-2-propylheptyle
ECHA :	European Chemical Agency
EMA :	European Medicines Agency
EPA :	Environmental Protection Agency
eV :	Electron volt
FDA:	Food and Drug Administration
FTIR :	Spectrométrie Infra Rouge à transformée de Fourier
h :	Heure
HC :	Haute concentration
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance
ICH :	International Conference of Harmonization
INERIS :	Institut national de l'environnement industriel et des risques
ISO :	International standard organization
LDM :	Limite de détection de la méthode
LLE :	Extraction liquide-liquide
LMS :	Limite de migration spécifique
LQM :	Limite de quantification de la méthode
m :	Masse
MCP :	Multicouche périmée
Min :	Minute
mol/L, g/L :	Mole/litre , gramme/litre
µL,mL,mg, Kg :	Microlitre , millilitre, milligramme, kilogramme
MP :	Matière première
NIAS:	Substances not intentionally added
NIST :	National institute of standards and technology
Nm, µm,cm :	Nanomètre, micromètre, centimètre
NP :	Nonylphénol
OP :	4-tert-octylphénol
PA :	Polyamide
Ph. Eu. :	Pharmacopée Européenne
PE :	Polyéthylène

pH :	Potentiel d'hydrogène
PP :	Polypropylène
PQRI :	Product Quality Research Institute
PVC :	Polychlorure de vinyle
PVCN :	Polychlorure de vinyle nouveau
PVCP :	Polychlorure de vinyle périmé
PVDC :	polychlorure de vinylidene
R ² :	Coefficient de regression
REACH:	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
Rf :	Rapport frontal ou facteur de rétention
RSD :	Déviation standard relative
SCENIHR :	Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks
SIM :	Selected Ion Monitoring
SPE :	Extraction sur phase solide
STP Pharma :	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
THF :	Tétrahydrofurane
TIC :	Total Ion Current
Tr :	Temps de rétention
USP :	United states pharmacopeia
UV :	Ultra-violet
WHO:	World Health Organization

APPENDICE B

GLOSSAIRE.

Absorption : phénomène physique correspondant à la pénétration des molécules de soluté dans la paroi du matériau.

Additif : substance ajoutée au produit, fabriquée par synthèse ou isolée par extraction.

Adjuvant: substance fabriquée par synthèse ou isolée par extraction ajoutée au matériau du contenant pour sa fabrication ou sa transformation.

Adsorption : phénomène physique de surface réversible traduisant l'adhésion des molécules du soluté à la surface du matériau. Interaction de type électrophile, hydrophile, nucléophile, forces de Van der Waals, produisant une couche monomoléculaire de soluté à l'interface liquide.

Analyte : Substance recherchée ou déterminée, objet de la méthode d'analyse.

Blanc: Essai réalisé en l'absence de matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (blanc matrice) ou qui provient d'un instrument (blanc instrumental).

Coefficient de variation (CV) : Souvent appelé l'écart-type relatif (RSD). C'est une mesure de précision des études quantitatives qui compare la variabilité des différents ensembles avec les différentes moyennes.

Compatibilité : résultante des interactions entre matériaux et formulation. Tests évaluant l'intégrité du packaging par rapport au produit fini, aucune interaction significative pouvant causer des modifications sérieuses entre le contenant et le contenu telles que la modification de l'efficacité du produit, la stabilité du produit, ou qui ajouterait un risque de toxicité.

Conditionnement primaire : partie du conditionnement qui est au contact direct avec le contenu.

Contenant : matériau ou objet d'emballage ou de conditionnement de la forme pharmaceutique.

Contenu : forme pharmaceutique conditionnée dans son conditionnement primaire.

Date de péremption : Date apposée sur le contenant ou l'étiquette d'une substance active, spécifiant la durée pendant laquelle la substance active est supposée rester à l'intérieur des spécifications établies pour sa durée de vie si elle est stockée dans des conditions définies, et après laquelle elle ne doit plus être utilisée.

Désorption : phénomène dans la continuité des phénomènes d'adsorption et d'absorption. Il s'agit de la traversée de la paroi du contenant par les molécules de la solution.

Écart type relatif (RSD) : C'est l'écart type, divisé par la valeur absolue de la moyenne arithmétique, exprimé en pourcentage. Il fait référence à la précision de la méthode. (appelé aussi le coefficient de variation CV).

Étude d'interaction : étude menée pour détecter les échanges entre les composants du contenant et le contenu, dans les conditions normales d'utilisation du produit, induisant des changements inacceptables dans la qualité du produit ou du conditionnement.

Excipient : substance autre que le principe actif entrant dans la composition du produit fini.

Extractibles : espèces chimiques extraites du contenant à l'aide d'un solvant approprié, dans des conditions extrêmes de température et de durée d'extraction.

Faux négatif : Échantillon pour laboratoire et/ou pour essai contenant l'analyte, pour lequel le résultat de la méthode d'analyse utilisée est négatif.

Faux positif : Échantillon pour laboratoire et/ou pour essai ne contenant pas l'analyte, pour lequel le résultat de la méthode d'analyse utilisée est positif.

Interférence : Réaction intrinsèque ou extrinsèque sans rapport avec l'analyte (par exemple, le bruit) due à des facteurs électroniques, chimiques ou autres en rapport avec les instruments, l'environnement, la méthode ou l'échantillon.

Méthode multi-résidus (MRM) : Une méthode permettant de déterminer un grand nombre de composés provenant généralement de différentes classes chimiques.

Migration : libération de substances (relargables) des composants du contenant vers le contenu dans des conditions normales d'utilisation. La migration est surtout étudiée dans le cas d'un contact liquide-solide (forme pharmaceutique liquide/matériau conditionnement solide).

Perméabilité : propriété physique d'un matériau qui se laisse traverser par un fluide (liquide, vapeur, gaz).

Perméation : phénomène physique consécutif à l'adsorption et l'absorption, correspondant à la traversée de la matrice par les molécules de soluté ou du milieu extérieur.

Relargable : substance chimique qui peut migrer du contenant vers le contenu dans les conditions normales d'utilisation ou pendant la durée de validité du produit.

Sécurité : les matériaux utilisés dans les contenants ne doivent pas relarguer des substances nocives ou indésirables qui exposeraient le patient lorsque celui-ci est traité par le médicament. La sécurité du patient nécessite la connaissance de la toxicité des additifs présents dans les matériaux.

APPENDICE C

Tableau C.1 : Résultats de la linéarité de la méthode d'analyse du DEHP par spectrométrie UV et par HPLC.

	Solution étalon	1	2	3	4	5	6
UV	C (mg/ml)	0,005	0,016	0,027	0,038	0,049	0,055
	A à 276nm	0,030	0,053	0,1	0,123	0,157	0,17
	A à 225nm	0,176	0,382	0,673	0,848	1,083	1,18
HPLC	C (mg/ml)	0,005	0,016	0,027	0,038	0,049	0,055
	S à 225 nm	247,34	429,58	800,42	1037,22	1286,41	1466,74
	S à 276 nm	29,187	62,62	113,34	141,82	183,80	198,02

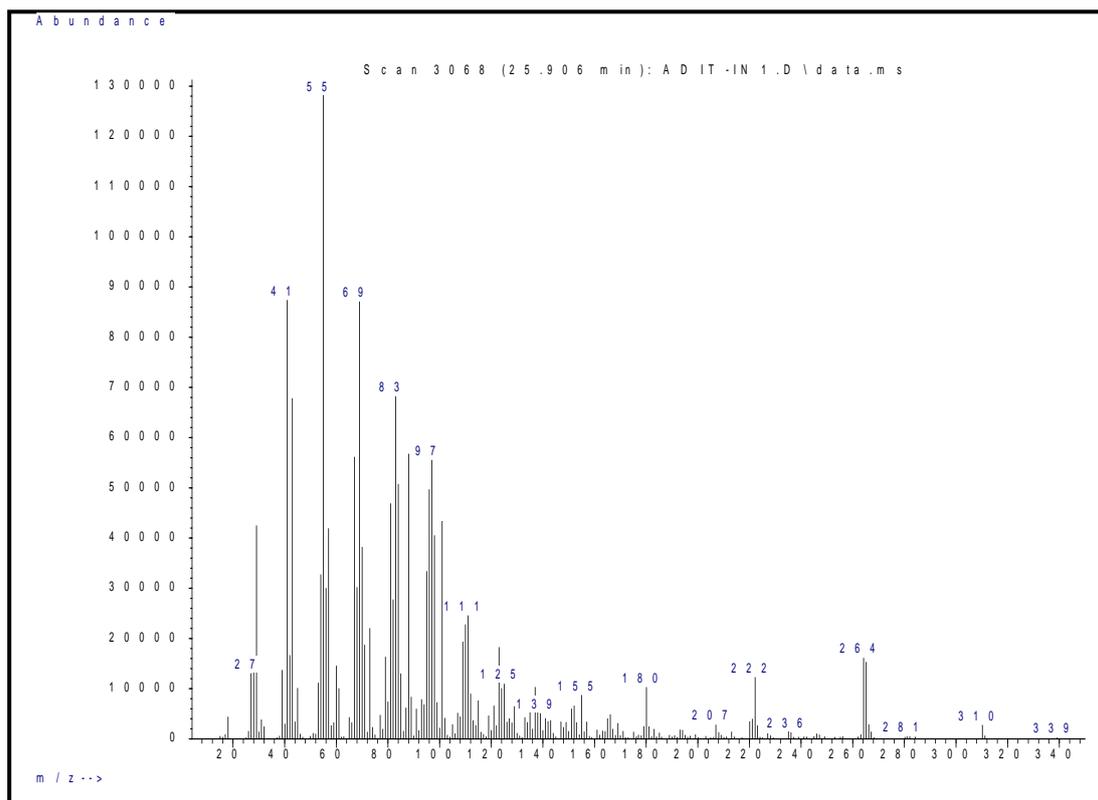


Figure C.1 : Spectre de masse de l'acide oléique

MODE OPERATOIRE: Analyse du DEHP dans le PVC plastifié à usage parentéral.

Objet : Ce mode opératoire permet de définir les étapes à suivre pour analyser le DEHP dans le matériau plastique en PVC à usage parentéral ; il est appliqué au granulé, au film et la poche.

Protocole d'extraction.

Solution échantillon: Prendre une pesée ($P_{éch}$) équivalente à 0.5g de matériau, dissoudre dans 25ml de THF (exempt de stabilisant), ajouter 50ml d'éthanol pour spectrométrie en petite quantité tout en continuant à agiter. Après reprecipitation du polymère, filtrer le mélange sur un verre fritté sous vide et récupérer le filtrat (sous forme de solution claire). Evaporer à sec et reprendre le résidu avec 25ml d'éthanol. Faire une dilution de 0.1ml dans 25ml du même solvant.

Solutions de référence : Dans une fiole de 50ml, dissoudre une prise d'essai ($P_{réf}$) de 50mg de DEHP dans l'éthanol, agiter et compléter au volume avec le même solvant . Faire une dilution de 0.5ml dans 25ml avec le même solvant.

Analyse du DEHP par spectrométrie UV.

L'analyse par spectrométrie UV sera appliquée dans le cas où le PVC utilisé ne contient pas, en plus du DEHP, d'autres additifs pouvant altérer l'analyse de ce dernier. Analyser la solution de référence et la solution échantillon (obtenue après extraction) par UV à 276nm et / ou 225nm.

Déterminer, à partir des absorbances obtenues, la teneur du plastifiant DEHP dans le PVC en appliquant la formule suivante :

$$\%(\text{DEHP}) = (A_{éch}/A_{réf}) \times (P_{réf} \times Dil_{réf}/P_{éch} \times Dil_{éch}) \times 100$$

Avec :

$A_{éch}$: Absorbance de la solution échantillon

$A_{réf}$: absorbance de solution de référence

$P_{réf}$: prise d'essai référence DEHP (MP)

$P_{éch}$: prise d'essai échantillon PVC plastifié

$Dil_{réf}$: dilution de la solution de référence

$Dil_{éch}$: dilution de la solution échantillon

Analyse du DEHP par chromatographie HPLC.

Dans le cas d'absence d'information sur la formule quantitative du PVC, la méthode HPLC sera exploitée car elle est plus sélective pour l'analyse du DEHP dans le matériau plastique.

Conditions chromatographiques:

Colonne : C18, 5µm de 20cm
Phase mobile : Méthanol
Débit : 0.8ml/min
Volume injecté : 20µl
Détection UV à 276nm et / ou 225nm

Analyser la solution de référence et la solution échantillon (obtenue après extraction) par HPLC. Déterminer, à partir des chromatogrammes, les surfaces des pics correspondants au DEHP dans les deux solutions. Calculer la teneur du DEHP dans le matériau en appliquant la formule suivante :

$$\%(\text{DEHP}) = (S_{\text{éch}}/S_{\text{réf}}) \times (P_{\text{réf}} \times \text{Dil}_{\text{réf}}/P_{\text{éch}} \times \text{Dil}_{\text{éch}}) \times 100$$

Avec :

$S_{\text{éch}}$: surface du pic de la solution échantillon
 $S_{\text{réf}}$: Surface du pic de la solution de référence
 $P_{\text{réf}}$: prise d'essai référence DEHP (MP)
 $P_{\text{éch}}$: prise d'essai échantillon PVC plastifié
 $\text{Dil}_{\text{réf}}$: dilution de la solution de référence.
 $\text{Dil}_{\text{éch}}$: dilution de la solution échantillon

Résultats.

La valeur du résultat obtenue doit être comparée aux normes fixées par le fournisseur, d'une part et ne doit pas dépasser 40% (selon la monographie de la pharmacopée européenne en vigueur).

Remarque.

La détection peut se faire dans chacune des deux longueurs d'ondes 276nm ou 225nm pour les deux méthodes UV et HPLC mais il est plus intéressant de le faire aux deux longueurs d'ondes pour confirmer le résultat.

APPENDICE D

Tableau D.1 : Variation des surfaces des bandes de vibration dans le cas du PVC.

Bande cm⁻¹	2017	2016	2015	2014 (Périmé)
615 *	45,47	40,27	42,30	48,89
638	57,97	53,71	61,01	58,11
693 *	55,33	54,66	60,05	52,51
834	27,91	25,12	23,07	24,17
1017	/	/	30,63	39,36
1099	84,91	70,68	55,46	27,29
1197	71,87	60,66	53,22	40,65
1257 *	116,06	125,98	120,51	122,72
1331 *	88,49	84,21	90,53	88,42
1351	28,17	22,42	26,14	26,26
1377	20,34	16,50	15,53	16,25
1433 *	47,22	39,35	41,58	43,42
1732	45,32	38,96	31,57	20,27
2816	17,08	14,71	16,14	15,35
2851 *	37,08	32,39	33,68	38,55
2913 *	119,24	121,68	132,78	123,28
2965 *	62,64	57,78	59,49	60,28

Tableau D.2 : Variation des surfaces des bandes de vibration dans le cas du PVC/PVDC.

Bande cm⁻¹	2017	2016	2015	2014 (Périmé)
615 *	45,69	40,22	41,92	47,63
693 *	48,25	44,42	43,71	40,97
835	45,54	40,29	39,40	41,96
1045	50,55	45,22	58,74	54,72
1071	50,00	44,31	50,53	57,16
1093	90,29	75,32	60,61	35,23
1170	50,33	58,90	55,16	60,35
1197	80,29	75,71	63,42	56,09
1254 *	70,89	80,51	72,29	75,64
1331 *	94,23	100,12	93,93	98,20
1353	50,29	46,79	52,99	49,82
1430 *	84,62	80,08	86,02	79,56
1734	47,68	35,90	25,20	15,28
2850 *	51,65	56,44	55,47	50,85
2913 *	85,32	80,79	87,38	90,25
2966 *	70,89	73,59	78,87	69,05

(*) Bandes spécifiques au matériau PVC et PVC/PVDC.

APPENDICE E

Tableau E.1 : Résultats de l'étude de la reproductibilité et la répétabilité de la méthode GC-MS (C = 0.3 µg/mL).

Composé	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP	DEHA	OP	BP	NP
Surface									
Reproductibilité	10656964	9016184	9910892	2192628	5383113	1199754	31490	2184789	1683667
	15133330	8842474	8780617	2924951	6243007	854258	27114	2021963	2459946
	13954731	8214309	7941272	2180807	8186385	920171	25762	2988427	2083667
	12396052	9929148	10287333	2635215	9667213	1010164	26892	1872115	2242334
	13732836	10848844	8396649	2460209	5013682	701760	30964	2028129	1883667
CV (%)	13,0	11,0	11,0	10,5	28,6	19,7	9,1	16,0	14,6
Répétabilité	13946696	9016184	10010892	2192628	5186385	920171	25762	2184789	1883667
	12022876	8214309	9681617	2498007	7285333	805165	25967	2052969	2273492
	13078083	9560455	8042222	2655115	6869219	955083	24270	2263420	2198896
	14876928	9109148	8259932	2466666	6012613	753262	27892	2524155	2048895
	13943006	8038844	8780617	2603159	5383113	1031760	26967	2086109	1913680
CV (%)	7,9	7,3	9,6	7,2	14,8	13,3	5,2	8,4	8,3

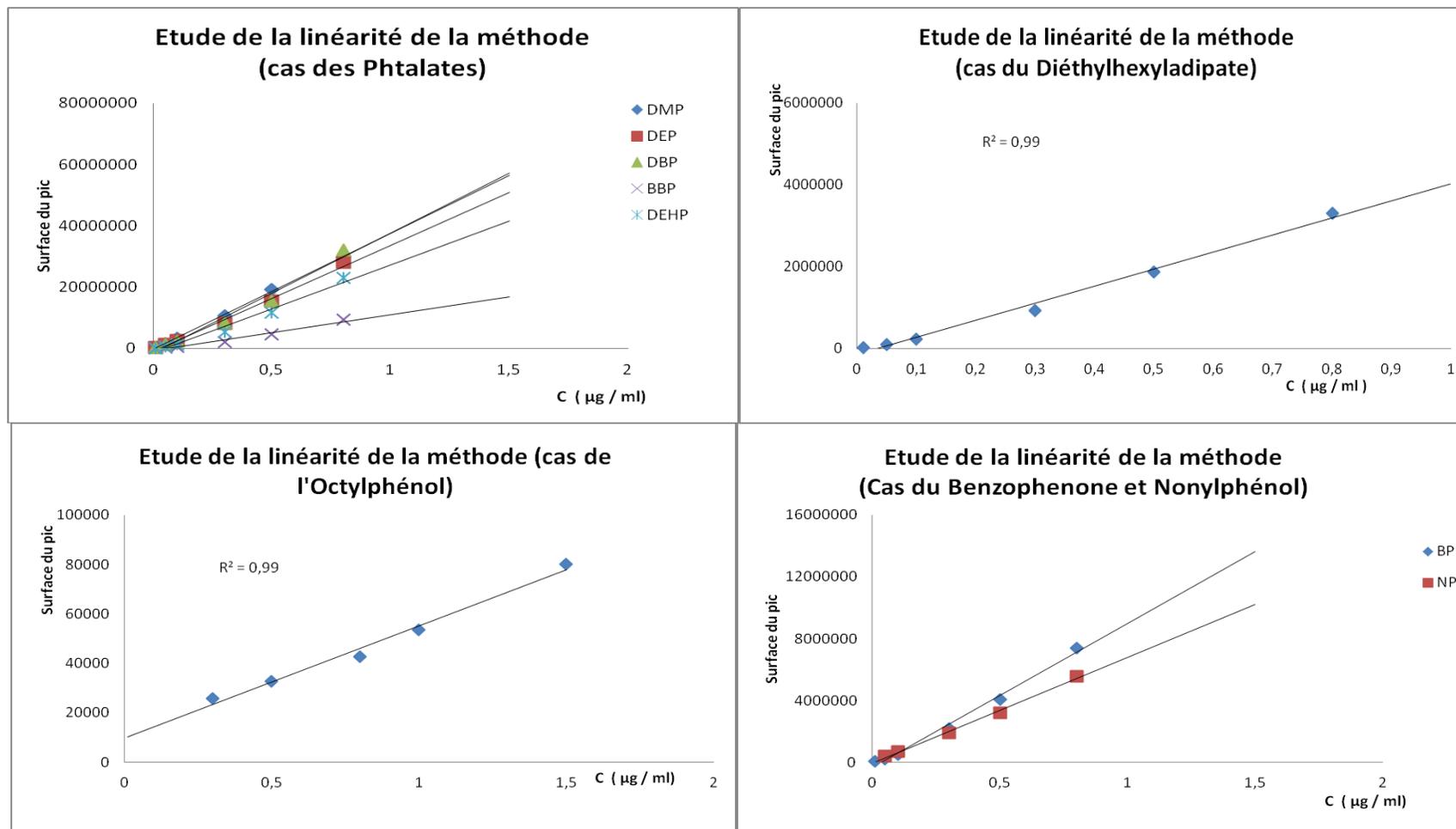


Figure E.1 : Courbes d'étalonnage des différents additifs analysés par GC-MS

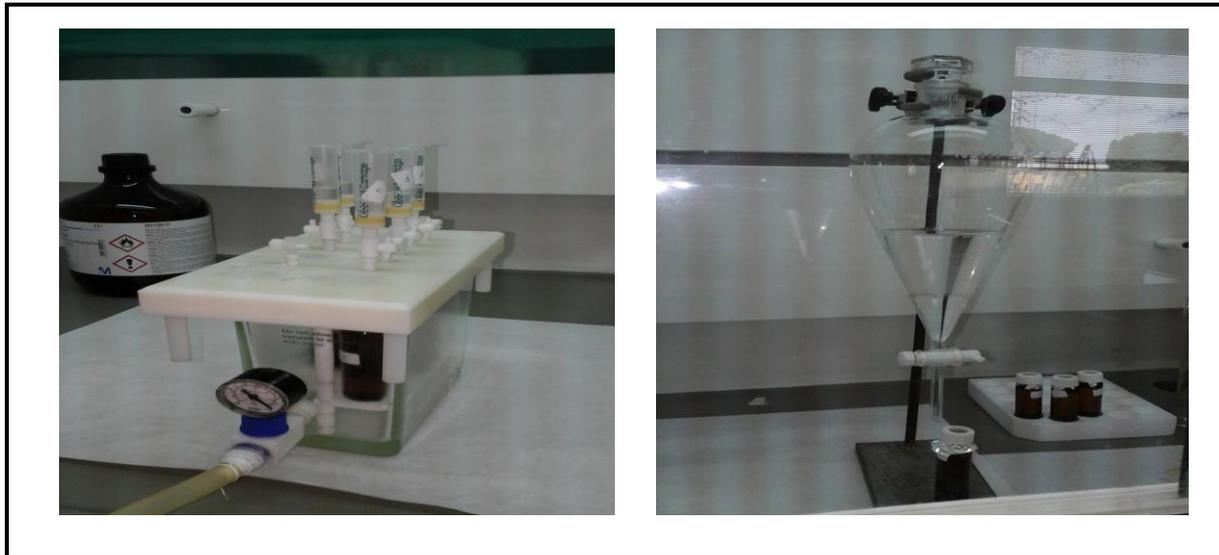


Figure E.2 : Procédés d'extraction des plastifiants par SPE et LLE

Tableau E.2 : Résultats des essais de migration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) à partir des matières premières en PVC (granulé et film) après stérilisation à $121\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 min (SPE, $n=3$).

Composés	DMP	DEP	DBP	DEHP	DEHA	BP
Taux $\mu\text{g}/\text{kg}$						
Film en PVC	28,63	130,85	39,15	44,51	45,83	32,95
	29,15	119,91	31,55	38,99	55,55	30,49
	29,66	145,88	28,55	32,56	67,94	33,51
M \pm Ecart type	29,14 0,5	132,21 13,0	33,08 5,4	38,68 6,0	61,74 8,7	32,31 1,6
Grain en PVC	30,65	260,51	31,85	4487,15	79,27	28,45
	28,15	229,73	39,23	5919,59	52,55	20,94
	29,95	259,02	41,58	5976,52	67,91	30,93
M \pm Ecart type	29,58 1,3	249,78 17,3	37,55 5,0	5461,08 844,0	66,57 13,4	26,77 5,2

Tableau E.3 : Taux de plastifiants ($\mu\text{g/L}$) dans les solutions pour perfusion conditionnées dans les poches en PVC, PVCN et MCP (par SPE ; $n = 3$).

Taux ($\mu\text{g/L}$)	PVCN		PVC	
Composés	NaCl	Glucose	NaCl	Glucose
DEHP	4,13	4,03	48,03	50,19
	3,88	4,31	47,11	51,89
	4,96	4,54	49,54	51,87
M \pm écart type	$4,32 \pm 0,56$	$4,29 \pm 0,25$	$48,2 \pm 1,22$	$51,30 \pm 0,97$
Taux ($\mu\text{g/L}$)	MCP			
Composés	NaCl		Glucose	
DEP	4,76		6,19	
	4,21		3,87	
	3,45		5,71	
M \pm écart type	$4,14 \pm 0,65$		$5,25 \pm 1,22$	
DBP	0,84		1,05	
	0,62		1,81	
	0,92		0,43	
M \pm écart type	$0,79 \pm 0,15$		$1,09 \pm 0,67$	

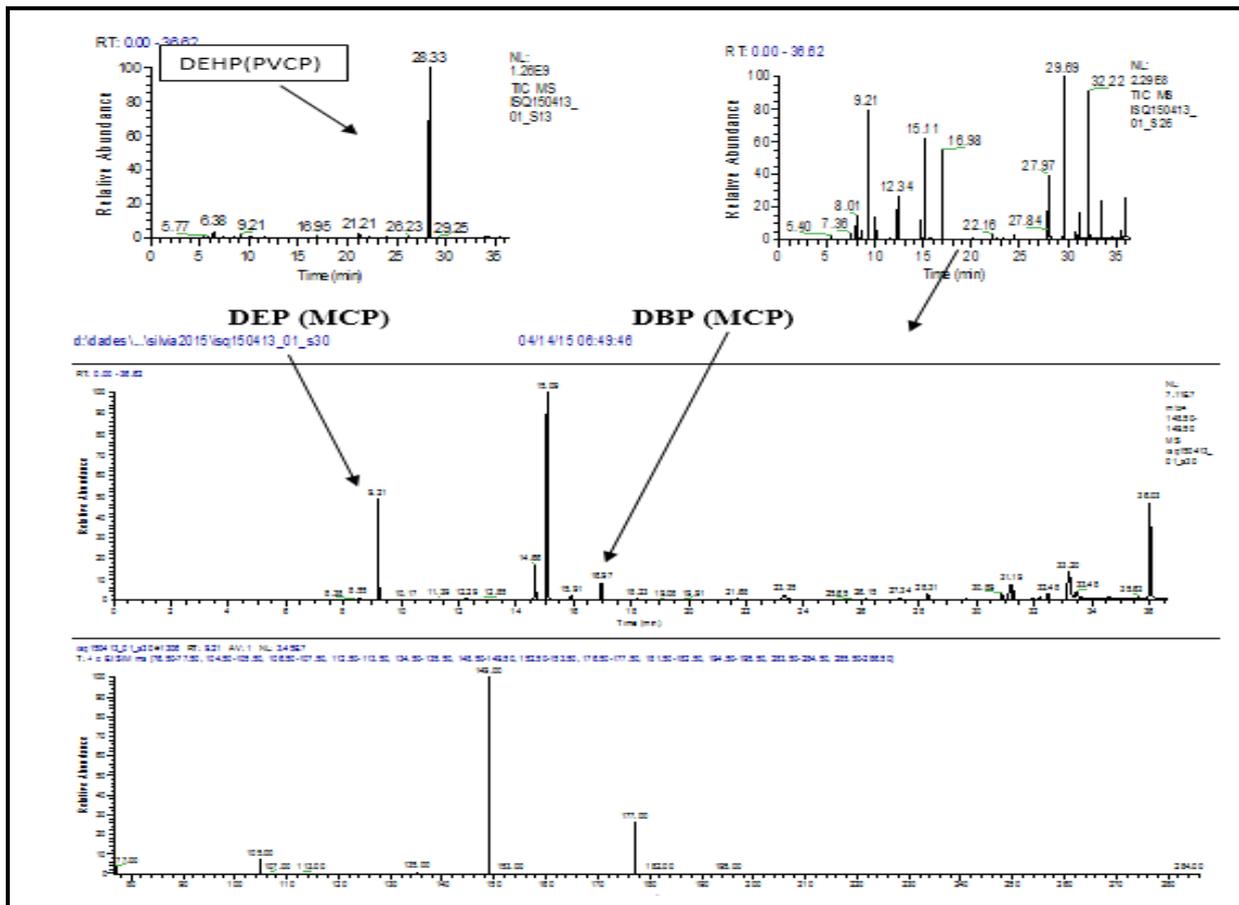
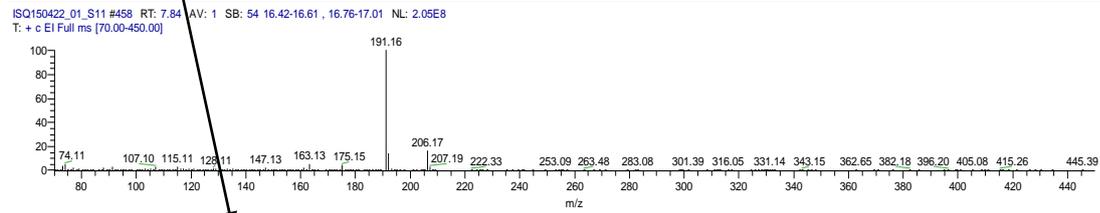
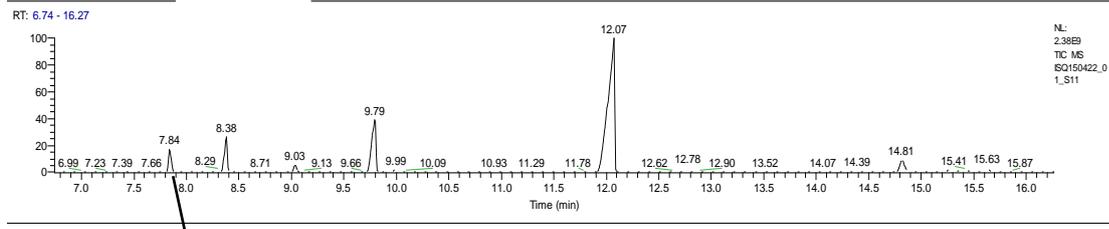
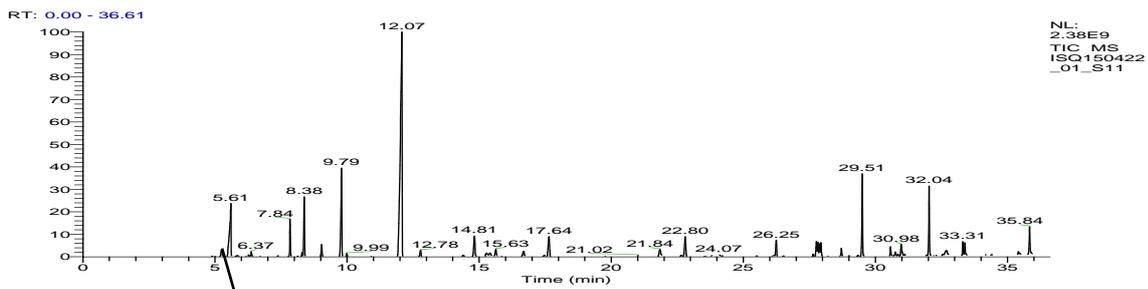


Figure E.3: Chromatogrammes de solutions pour perfusion conditionnées dans du PVC et dans la MCP (mode TIC à $M/z = 149$ pour les phtalates).



Hit	SI	RSI	Prob	Name	Library Name
1	944	946	57.64	2,4-...	replib
2	938	938	57.64	2,4-...	mainlib
3	923	923	57.64	2,4-...	replib
4	902	924	12.93	Pho...	replib
5	895	898	10.10	Pho...	replib
6	893	895	10.10	Pho...	replib
7	889	892	7.78	Pho...	mainlib
8	884	884	10.10	Pho...	mainlib
9	881	883	12.93	Pho...	replib
10	881	881	12.93	Pho...	replib

2,4-Di-tert-butylphenol
Formula C14H22O, MW 206, CAS# 96-76-4, Entry# 27865
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-

CC(C)(C)c1ccc(C(C)(C)C)c1


ISQ150422_01_S11 #183 RT: 5.53 AV: 1 SB: 54 16.42-16.61, 16.76-17.01
T: + c EI Full ms [70.00-450.00]



Hit	SI	RSI	Prob	Name	Library Name
1	937	940	86.84	Caprolactam	mainlib
2	925	947	86.84	Caprolactam	replib
3	921	939	86.84	Caprolactam	replib
4	921	924	86.84	Caprolactam	replib
5	855	874	86.84	Caprolactam	replib
6	821	822	5.08	α-Methyl-α-propylsu...	mainlib
7	796	798	5.08	α-Methyl-α-propylsu...	replib
8	793	855	1.46	Flucytosine	nist_msm
9	791	793	1.35	3,4-Methylpropylsuc...	mainlib
10	784	853	1.03	5-Hydroxy-4,5-dimet...	mainlib

Caprolactam
Formula C6H11NO, MW 113, CAS# 105-60-2, Entry# 1075
2H-Azepin-2-one, hexahydro-

O=C1NCCCCC1

Figure E.4 : Scan de la solution de perfusion conditionnée dans la MCP (dérivé de l'Irgaphos 168, Caprolactame et dérivé de l'adipate).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Guidelines on packaging for pharmaceutical products, WHO Technical Report Series, N° 902, (2002), Annex 9.
2. Marchés Européens des plastiques (2008), www.plasticseurope.org, (visité en juillet 2017).
3. Hermabessiere L., Dehaut A., Paul-Pont I., Lacroix C., Jezequel R., Soudant P., Duflos G., “Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review”, *Chemosphere* 182, (2017), 781-793.
4. Hahladakis J.N., Velis C.A., Weber R., Lacovidou E., Pumell P., “An overview of chemical additives present in plastics : Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling”, *J. of Hazardous Materials* 344, (2018), 179-199.
5. Gallart-Ayala H., Núñez O., Paolo L., “Recent advances in LC-MS analysis of food-packaging contaminants”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 42, (2013), 99-124.
6. Lashi A., Senhal N., Alarcon A., Barcelo B., “Interaction contenant-contenu II. Méthodologie”, *STP Pharma Pratiques*, V.17, n° 3, (2007).
7. Règlement de la Commission n° 10/2011 /CE de la Commission européenne du 14 janvier 2011 relatif aux matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires, JO L 12 du (13 mars 2014), 4-12.
8. Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction de l'étendue des produits (18 décembre 2006).
9. Demande Européenne en plastique et résine (2009), www.plasticseurope.org, (visité en juillet 2017).
10. Wypych G., “Handbook of plasticizers ”, 2ième Ed., Chem. Tec. Publishing, Canada (2017).
11. National Research and Safety Institute INERIS, “ Phthalate de bis (2 ethylhexyle) ”, (2005).
12. Conseil européen des plastifiants et intermédiaires ECPI, Centre d'information sur les plastifiants et le PVC souple, (2012), <http://www.plasticisers.org>
13. Règlement (CE) n ° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges.
14. Gotardo M.A., Monteiro M., “Migration of diethylhexyl phthalate from PVC bags into intravenous cyclosporine solutions”, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 38, (2005), 709-713.
15. Inoue K., Kawaguchi M., Okada F., Yoshimura Y., Nakazawa H., “Column-switching high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples”, *Anal. Bioanal. Chem.* 375, (2003), 527-533.
16. Hongyu L., Guangyu S., Yanping S., Yong Shen, Kai Xu, “Evaluation of the Di (2-

- ethylhexyl) phthalate released from polyvinyl chloride medical devices that contact blood”, Springer Plus, (2014), 3:58.
17. Loff S., Subotic U., Reinicke F., Wischmann H., Brade J., “Extraction of Diethylhexyl-phthalate from perfusion lines of various material, length and brand by lipid emulsions”, *J. Ped. Gastroent. Nutrit.*, 39 (4), (2004), 341-345.
 18. Kambia NK., Dine T., Dupin-Spriet T., Gressier B., Luyckx M., Goudaliez F., Brunet C., “Compatibility of nitroglycerin, diazepam and chlorpromazine with a new multilayer material for infusion containers”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37, (2005) 259-264.
 19. Takehisa H., Naoko E., Masahiko S., Katsuhide T., Moriyuki O., Keizoh S., Mutsuko T., Kenji K., Shin'ichiro N., Toshio O., “Release behavior of diethylhexyl phthalate from the polyvinyl-chloride tubing used for intravenous administration and the plasticized PVC membrane”, *Int. J. Pharm.*, 297, (2005), 30-37.
 20. Haishima Y., Seshimo F., Higuchi T., Yamazaki H., Hasegawa C., Izumi S., Makino T., Nakahashi K., Ito R., Inoue K., Yoshimura Y., Saito K., Yagami T., Tsuchiya T., Nakazawa H., “Development of a simple method for predicting the levels of di (2-ethylhexyl) phthalate migrated from PVC medical devices into pharmaceutical solutions”, *Int. J. Pharm.*, 298, (2005), 126-142.
 21. Rose RJ., Priston MJ., Rigby-Jones AE., Sneyd JR., “The effect of temperature on di (2-ethylhexyl) phthalate leaching from PVC infusion sets exposed to lipid emulsions”, *Anaesthesia*, 67(5), (2012), 514-520.
 22. Directive 2005/84 / CE du Parlement européen et du Conseil du 14 décembre 2005 en ce qui concerne la commercialisation et l'utilisation de certaines substances et préparations dangereuses (phtalates dans les jouets et articles de puériculture).
 23. Loi n°2012-1442 (du 24 décembre 2012) visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A.
 24. Directive 2007/47 / CE du Parlement européen et du Conseil (du 5 septembre 2007) concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux dispositifs médicaux implantables actifs.
 25. Pharmacopée Européenne 8.0; 3.1.14: Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour récipients destinés à contenir les solutions aqueuses pour perfusion intraveineuse.
 26. Loff S., Kabs F., Subotic U., Schaible T., Reinecke F., Langbein M., “Kinetics of diethylhexyl-phthalate extraction from polyvinylchloride-infusion lines”, *J. of Parenteral and Enteral Nutrition*, 26, (2002), 305-309.
 27. Bourdeaux D., Sautou-Miranda V., Bagel-Boithias S., Boyer A., Chopineau J., “Analysis by liquid chromatography and infrared spectrometry of di(2-ethylhexyl) phthalate released by multilayer infusion tubing”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35, (2004), 57-64.
 28. Eric Postaire, “Les matières plastiques à usage pharmaceutique”, Ed. Médicales Internationales, Paris, (1991).
 29. ISO 15378, “Articles de conditionnement primaire pour médicaments”, (2006).
 30. Bulchandani Hitesh H., “Pharmaceutical packaging, component and evaluation”, M.

Pharm. Sem-II (2006).

31. Alsopp MW., Vianello G., "Vinyl Chloride Polymers in Encyclopedia of Polymer Science and Technology", 4th Ed., New York, (2014).
32. Hruska Z., Guesnet P., Salin C., Couchoud J.J., "Poly (chlorure de vinyle) ou PVC", Techniques de l'ingénieur, am3325v3, (2007).
33. ISO 1043-1, "Plastics - Symbols and abbreviated terms", Part 1 in Basic polymers and their special characteristics, (2011).
34. INERIS, "Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : CHLORURE DE VINYLE", (2010).
35. REACH for Polymers, "Guide des meilleures méthodes d'essai et techniques disponibles", (2011).
36. Crompton R., "Determination of Additives in Polymer and Rubbers", Rapra Technology, (2007).
37. Guide pratiques sur les phtalates, EURO PHARMA (2010).
38. Piringer Otto G., Baner Albert L., "Plastic Packaging, Interactions with Food and Pharmaceuticals", 2nd Ed., WILEY-VCH, (2008) .
39. Dennis Jenke, "Compatibility of Pharmaceutical Products and Contact Materials", JohnWiley & Sons, (2009).
40. Daniels P.H., "A brief Overview of theories of PVC plasticization and methods used to evaluate PVC-plasticizer interaction", J. of Vinyl and Additive Technology, (2009).
41. Guillaume Gillet, Thèse de Doctorat en procédés biotechnologique et alimentaire, "Prévision de la conformité des matériaux d'emballage par intégration de méthode de formulation et de modélisation du coefficient de partage", Institut national polytechnique de Lorraine (2008).
42. Le Hir A., Chaumeil J-C., Brossard D., "Pharmacie galénique, bonnes pratiques de fabrication des médicaments", Ed. Elsevier /Masson, (2009).
43. Pellerin F., "Interaction contenant-contenu", S.T.P. Pharma Pratiques, V. 6, n°10, (1990).
44. Laschi A., Senhal N., Alarcon A., Barcelo B., Caire-Maurisier F., Delaire M., Feuilloley M., Genot S., Lacaze C., Pisarik L., Smati C., "Interaction contenant-contenu. I. Réglementation", S.T.P. Pharma Pratiques, V.17, n°3, (2007).
45. Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials, European Medicines Agency, EMEA/CVMP/CHMP/205/04, London, (19 May 2005).
46. Guidance for Identification and Naming of Substances under REACH, European Chemicals Agency, (2007).
47. Norwood DL., Paskiet D., Ruberto M., Feinberg T., Schroeder A., Poochikian G., Wang Q., Deng TJ., De Grazio F., Munos MK., Nagao LM., "Best practices for extractables and leachables in orally inhaled and nasal drug products, An overview of the PQRI recommendations", Pharm. Res., 25(4), (2008) , 727-739.
48. Paskiet D., Jenke D., Ball D., Houston C., Norwood DL., Markovic I., "Leachables and extractables working group initiatives for parenteral and ophthalmic drug product", PDA J. Pharm. Sci. Technol., 67(5), (2013), 430-447.

49. Guidance for industry, “Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics, chemistry, manufacturing, and controls documentation”, U.S. Food and Drug Administration FDA, Rockville MD, (1999).
50. ISO 10993-2 , “Évaluation biologique des dispositifs médicaux, exigences concernant la protection des animaux”, (2006).
51. ICH harmonised tripartite guideline S2 (R1), “Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use”, (2011).
52. Pharmacopée Européenne, 9, 3.1“Matériaux utilisés pour la fabrication des récipients”, (2017).
53. U.S. Pharmacopeia, <1663>, “Assessment of Extractables Associated With Pharmaceutical Packaging / Delivery Systems”.
54. U.S. Pharmacopeia, <1664> “Assessment of Drug Product Leachables Associated With Pharmaceutical Packaging / Delivery”.
55. Session d’études, “Injectables et compatibilité des matériaux en contact”, SFSTP, Paris, (2012).
56. Commission Européenne, direction générale de la santé et de la protection des consommateurs de la CE, Avis sur les dispositifs médicaux contenant du PVC plastifié au DEHP : Les nouveau-nés et d’autres groupes potentiellement exposés à la toxicité du DEHP”, (2002)
57. Directive 2007/47/CE du Parlement Européen et du Conseil du 5 septembre 2007 modifiant la directive 90/385/CEE du Conseil concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux dispositifs médicaux implantables actifs, la directive 93/42/CEE du Conseil relative aux dispositifs médicaux et la directive 98/8/CE concernant la mise sur le marché des produits biocides.
58. Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l’étiquetage et à l’emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le Règlement (CE) n° 1907/2006.
59. Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks (SCENIHR); “The safety of medical devices containing DEHP plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk”, (2015).
60. Agence Française de sécurité sanitaire et des produits de santé (Afssaps), “Recommandations portant sur les phtalates dans les dispositifs médicaux”, (2009).
61. Norme EN 15986, “Symbole à utiliser pour l’étiquetage des dispositifs médicaux- Exigences relatives à l’étiquetage des dispositifs médicaux contenant des phtalates”, (2011).
62. United States Food and Drug Administration (FDA), Center for Devices and Radiological Health, “Safety Assessment of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices”, Rockville, MD, (2001).
63. Saint-Laurent L., Rhainds M., “Etat des connaissances sur la toxicité et l’exposition humaine aux Phtalates”, Institut National de Santé Publique du Québec, (2004).

64. Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR), “Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP)”, NTP-CERHR, (2006).
65. Institute of health and consumer protection, toxicology and chemical substance, “Bis (2-ethylhexyl) Phtalate (DEHP), Risk assessment report”, (2008).
66. Stéphanie Perraut, “Les ultrasons, une alternative verte pour l'extraction”, Process Alimentaire, (2013).
67. Robert H. Perry, Don W. Green, James O. Maloney; “Perry's chemical engineers' handbook”, Mc Graw-Hill, ed. 7, (1997).
68. Valérie Desauziers, “Extraction sur phase solide pour échantillonnage de micropolluants”, Technique de l'ingénieur, P3850 v1, (2004).
69. Chapuis F., Pichon V., Hennion M-C., “Méthode de pré-concentration par extraction en phase solide: Principe et application aux industries environnementales et pétrolières”, Oil & Gas Science and Technology, V.60, n°6, (2005), 899-912.
70. Bulletin 910 SUPELCO, “Guide to Solid Phase Extraction”, T197910, Sigma-Aldrich, (1998).
71. Farre M., Martinez F., Barcelo D., “Techniques de détermination de composés organiques dans l'environnement”, Techniques de l'ingénieur, P3820 v1, (2008).
72. Veynachter B., Pottier P., “Centrifugation et décantation”, Technique de l'ingénieur, F2730 v1, (2007).
73. Rouessac F., Rouessac A., “Analyse Chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes”, 6^{ième} éd., Dunod, Paris, (2004).
74. Dalibart M., Servant L., “Spectroscopie dans l'infrarouge”, Techniques de l'Ingénieur, P2845 v3, (2000).
75. Arpino P., “Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse”, Techniques de l'Ingénieur, P1491 v1, (2008).
76. International Conference on Harmonisation ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, “Validation of Analytical Procedures: definitions and terminology, Methodology”, adopted in Geneva, (1996).
77. International Conference on Harmonisation ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology”, Q2 (R1), (2005).
78. Food and Drug Administration (FDA) GUIDANCE DOCUMENT, “Validation of Analytical Procedures: Methodology”, Q2B, (1997).
79. ISO 5725-1, “Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure- Partie 1: Principes généraux et définitions”, (1994).
80. Directive sur les critères de performance pour les méthodes d'analyse en vue de la détermination des résidus de pesticides dans les produits destinés à l'alimentation humaine et animale, Codex alimentarius, CXG 90, (2017).
81. Agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail - Pôle Recherche et Référence, “Guide de validation des méthodes d'analyses”, ANSES/ PR3/07/01, version a, (2015).

82. Caporal-gautier J., Nivet J., Algranti P., Guilloteau M., Histe M., Lallier M., N'guyen-huu J., Russotto R., "Guides de validation analytique, I : Méthodologie, II : Exemples d'application", S.T.P. pharma pratiques, techniques réglementations, 2 (4), (1992), 205-226 et 227-239 .
83. Amalric L., Rados P., Lardy-Fontan S., "Identification des caractéristiques des méthodes multi résidus par l'analyse des substances organiques dans les eaux et leurs exigences métrologiques", Programme scientifique et technique AQUA-REF, (2012).
84. Guide Citac / Eurachem, "Guide pour la Qualité en Chimie analytique : Aide pour l'accréditation", (2002).
85. Food and Drug Administration (FDA) Guidance for Industry, "Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics", (2015).
86. Pharmacopée européenne, monographie 3.1.1.2. , "Matériaux à base de poly(chlorure de vinyle) plastifié pour tubulures utilisées dans les nécessaires pour transfusion du sang et des composants sanguins", (2008).
87. EMEA, "Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology", CPMP/ICH/381/95, (2006).
88. Kazusaki M., Ueda S., Takeuchi N., Ohgami Y., "Validation of analytical procedures by high performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis Chromatography", V. 33, n°2, (2012).
89. Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B., Chapuzet E., "Validation des procédures analytiques quantitatives: Harmonisation des démarches, Partie III. Exemples d'application", STP pharma pratique, 16, (2006), 87-121.
90. Faouzi M.A., Dine T., Luyckx M., Gressier B., "Leaching of diethylhexyl phthalate from PVC bags into intravenous teniposide solution", Int. J. of Pharm, 105, (1994), 89-93.
91. Aignasse M.F., Prognon P., Stachowicz M., Gheyouché R., Pradeau D., "A new simple and rapid HPLC method for determination of DEHP in PVC packaging and releasing studies", Int. J. of Pharm., 113, (1995), 241-246.
92. Sircar D., Atallah Y., Albazi J.S., Pizz W., " Validation and Application of an HPLC Method for Determination of Di (2-ethylhexyl) Phthalate and Mono (2-ethylhexyl) Phthalate in Liver Samples", J. of Chromatographic Science, V.46, (2008).
93. Zaater M.F., Tahboub Y.R., Al Sayyed A.N., " Determination of Phthalates in Jordanian Bottled Water using GC-MS and HPLC-UV: Environmental Study", J. of Chromatographic Science, V.52, (2014), 447-452.
94. Chaudhary A.K., Yadav S., Waske S.A., Chandrashekhar T .G., "Validated Reverse Phase HPLC Method for the Determination of DEHP Content in Reconstituting Diluents and in Reconstituted Solutions of Imipenem and Cilastatin for Injection" , E-Journal of Chemistry, 7(2), (2010).
95. Bolgar M., Hubball J., Groeger J., Meronek S., "Handbook for the Chemical Analysis of Plastic and Polymer Additives", Ed.1, CRC Press, Taylor and Francis Group, (2008).
96. Ito R., Seshimo F., Haishima Y., Hasegawa C., Isama K., Yagami T., Nakahashi K., Yamazaki H., Inoue K., Yoshimura Y., Saito K., Tsuchiya T., Nakazawa H.,

- “Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical devices”, *Int. J. of Pharm.*, 303, (2005),104-112.
97. Lahimer M.C., Ayed N., Horriche J., Belgaied S., “Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity”, *Arabian Journal of Chemistry*, (2013).
 98. Coltro L., Pitta J.B., Madaleno E., “Performance evaluation of new plasticizers for stretch PVC films”, *Polymer Testing*, 32, (2013), 272-278.
 99. METHOD 8061A, “Phthalate esters by gas chromatography with electron capture detection”, (1996).
 100. Bart J.C. J., “Direct solid sampling methods for gas chromatographic analysis of polymer/additive formulations”, *Polymer Testing*, 20(7), (2001), 729-740.
 101. Bart J.C. J., “Plastics Additives: Advanced Industrial Analysis”, IOS Press, Nieuwe Hemweg 6B, Netherlands, (2006).
 102. U. S.Consumer product safety commission directorate for laboratory sciences division of chemistry, “Standard Operating Procedure for Determination of Phthalates”, MD 20878 Test Method: CPSC-CH-C1001-09.3, (2010).
 103. You Zou, Min Cai, “Determination of Phthalate concentration in toys and children’s products by gas chromatography-mass spectrometry”, Agilent Technologies, (2013).
 104. Jaworek K., Czaplicka M., “Determination of phthalates in polymer materials: Comparison of GC/MS and GC/ECD methods”, *Polímeros*, V.23 (6), (2013).
 105. ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé), Rapport sur le Contrôle du marché des dispositifs médicaux en PVC annoncés sans DEHP, (Mai 2016).
 106. Kostić I.S., Anđelković T.D., Anđelković D.H., Cvetković T.P., Pavlović D.D., “Determination of di (2-ethylhexyl) phthalate in plastic medical devices”, *Scientific Paper, Hem. Ind.* 70 (2), (2016), 159-164.
 107. Strac I.V., Pušić M., Gajski G., Garaj-Vrhovac, “Presence of phthalate esters in intravenous solution evaluated using gas chromatography-mass spectrometry method”, *J. of Appl. Toxicol.*, 33(3), (2013), 214-219.
 108. Hongyu L., Guangyu S., Yanping S., Yong S., Kai Xu L., “Evaluation of the Di(2-ethylhexyl)phthalate released from polyvinyl chloride medical devices that contact blood”, *Springer Plus*, 3:58 (2014).
 109. Gimeno P., Thomas S., Bousquet F., Maggio A.F., Civade C., Brenier C., Bonnet P.A.; “Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalates plasticizers in PVC medical devices by GC-MS”, *J. Chromatogr B , Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2014), 949-950, 99-108.
 110. SCENIHR Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks, “The safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk”, (2015).
 111. Howick C., “Studies of molecular interactions between PVC and plasticisers in Plastics, Rubber and Composites Processing and Applications”, 23(1), (1995), 53-60.

112. Bajjayantimala G., Swaminathan S., "Study of polymer-plasticizer interaction by ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy: Poly(vinyl chloride)-bis(2-ethylhexyl) phthalate system", *Macromolecules*, 29(1), (1996), 185-190.
113. Rouzeau S., Pinel C., Fogassy G., Gelbard G., Cassagnau P., "Procède de Preparation de Bioplastifiants de Polymeres", Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. Date de la publication internationale 19 novembre 2009 (19.11.2009), Numéro de publication internationale W O 2009/138508 A 1.
114. Dong Il Noh, Kyu Nam Park, Heung Jae Chun, "Compatibility of Diazepam with Polypropylene Multilayer Infusion Container", *Macromolecular Research*, V. 17, n°7 (2009), 516-521.
115. Pharmacopée Européenne, 6^{ième} éd, "Matériaux PVC non plastifié pour formes sèches (orales)", (2007).
116. M.A. da Silva, M.G.A. Vieira, A.C.G. Maçumoto, M.M. Beppu, "Polyvinylchloride (PVC) and natural rubber films plasticized with a natural polymeric plasticizer obtained through polyesterification of rice fatty acid", *Polym. Testing* 30 (2011), 478- 484.
117. Luz C.G.A. Panzarini, Selma M.L Guedes, " FTIR Spectroscopy characterization of PVC films grafted and heparinized by gamma radiation", *Congresso Brasileiro de Polímeros*, (2005).
118. González N., Fernández-Berridi M.J., "Fourier transform infrared spectroscopy in the study of the interaction between PVC and plasticizers: PVC/plasticizer compatibility", *J. Applied Polymer Sci*, (2007).
119. Ramesh S., Leen K.H., Kumutha K., Arof A.K., "FTIR studies of PVC/ PMMA blend based polymer electrolytes", *Spectrochimica Acta, Part A*, 66 (4-5) (2007), 1237-1242.
120. FRINGANT C., "PVDC et copolymères du chlorure de vinylidène", *Techniques de l'ingénieur*, J6570 v1, (2004).
121. Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra for Qualitative Analysis. ASTM International, E1252-98, (2013).
122. Hummel, Dieter O., "Atlas of plastics additives, analysis by spectrometric methods", (2002).
123. Afssaps - fiche technique (FDCQ02), "Identification des matières premières à réception par proche infra-rouge", version1 du 13/07/07.
124. Thomas S., Grohens Y., Jyotishkumar P., "Characterization of Polymer Blends", Wiley VCH, (2014).
125. Bach C., Dauchy X., David L., Étienne S., "Physico-chemical study of PET bottles and PET bottled water", *Matériaux & Techniques* 99, (2011), 391-408.
126. Safa L., Zaki O., Leprince-Wang Y., Feigenbaum A., "Evaluation of Model Compounds-Polypropylene Film Interactions by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) Method", *Packaging Technology and Science* 21(3), (2008), 149-157.
127. Jenke D., "Evaluation of the Chemical Compatibility of Plastic Contact Materials and Pharmaceutical Products; Safety Considerations Related to Extractables and Leachables", *J. of Pharm. Sciences*, 96(10),(2007), 2566-2581.

128. S.T.P. Pharma Pratiques, "Compatibility of materials in contact with parenteral preparations, Risk analysis and strategy", V.23, Issue 2,(March 2013), 59-96.
129. Jenke D., "Compatibility of Pharmaceutical Products and Contact Materials, Safety Considerations Associated with Extractables and Leachables", John Wiley & Sons (2008).
130. Guide Compatibilité Contenant/Contenu du Conseil National de l'Emballage, (Mai 2017), <http://www.contactalimentaire.com>
131. Vitrac O., Joly C., "Bases physicochimiques pour l'évaluation de la conformité des matériaux au contact des aliments", UMR, INRA, (2007).
132. Zaki O., Abbès B., Safa L., "Non-Fickian diffusion of amyl acetate in polypropylene packaging: Experiments and modelling", *Polymer Testing*, 28 (3), (2009), 315-323.
133. Bono-Blay F., Guart A., de la Fuente B., Pedemonte M., Pastor M.C., Borrell A., Lacorte S., "Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling", *Envir. Sci. Poll. Res.* 19, (2012), 3339-3349.
134. NF T90-210, "Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire", (version 2009).
135. NF ISO 12787, T75-612, "Cosmétiques - Méthodes analytiques - Critères de validation pour les résultats analytiques utilisant des techniques chromatographiques", (2012).
136. NF ISO 22892, X31-439, "Qualité du sol- Lignes directrices pour l'identification de composés cibles par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse", (2011).
137. Guart A., Bono-Blay F., Borrell A., Lacorte S., "Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk ", *Food Addit. Contam.*, 28 (2011), 676-685.
138. International Conference of Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) : Q1A (R2), "Stability Testing of New Drug Substances and Products", (2003).
139. Fankhauser-Noti A., Grob K., "Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and tricks", *Anal. Chim. Acta.*, 582 (2007), 353-560.
140. Sørensen L.K., "Determination of phthalates in milk and milk products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry", *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 20 (7), (2006), 1135-1143.
141. Environmental Protection Agency United States EPA, Method 625, "Base/Neutrals and Acids".
142. Environmental Protection Agency United states EPA, Method 525.2: "Determination of Organic Compounds in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry".
143. Environmental Protection Agency United States EPA, Method 606: "Phthalate Ester".
144. Directive 2008/105 / CE du Parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de la politique

de l'eau.

145. Demoré B., Vigneron J., Perrin A, Hoffman M.A., Hoffman M., “Leaching of diethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride bags into intravenous Etoposide solution”, *J. Clinical Pharm. Therap.* 27 (2002), 139-142.
146. Bernard L., Cueff R., Breysse C., Décaudin B., Sautou V., “Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions”, *Internat. J. Pharmac.*, 485, (2015) 341-347.
147. Règlement 793/93/ CEE de mars 1993 relatif à l'évaluation des risques effectuées par l'UE sur les produits chimiques existants; *Journal officiel des Communautés européennes*, L48/1, CE, 1994.
148. European Chemical Agency (ECHA), “Review of reach with regard to the registration requirements on polymers”, *Final Report Part A: Polymers*, (2012).
149. INERIS, “Données technico-économiques sur les substances chimiques en France: Substituts du DEHP”, *DRC-12-126866-13682A*, (2012).
150. Rahman M., Brazel C.S., “The plasticiser market: An assessment of traditional plasticisers and research trends to meet new challenges”, *Progress in Polymer Science*, 29 (2004), 1223-1248.
151. Muncke J., “Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: An updated review of exposure, effect and risk assessment”, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127 (2011), 118-127.
152. Félez C., Molet A., Núñez O., “Field-Amplified Sample Injection-Micellar Electrokinetic Chromatography for the Determination of Benzophenones in Food Simulants”, *Chromatography 2*, (2015), 452-471.
153. Wong M.D., Firor R.L., “Analysis of Extractable/Leachable Compounds from Transdermal Patches Using GC/MSD Systems”, *Agilent Technologies, Inc. USA*. (2015), www.agilent.com/chem.
154. Nakajima D., Asada S., Kageyama S., Yamamoto T., Kuramochi H., Tanaka N., Takeda K., Goto S., “Activity Related to the Carcinogenicity of Plastic Additives in the Benzophenone Group”, *J. of The UOEH Association of Health Sciences*, 28 (2006), 143-146.
155. Rhodes M., Bucher J.R., Peckham J.C., Kissling G.E., Hejtmancik M.R., Chhabra R.S., “Carcinogenesis studies of benzophenone in rats and mice”, *Food Chem. Toxicol.*, 45 (2007), 843-851.
156. Jaeger R.J., Rubin R.J., “Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues”, *New England Journal of Medicine* 287, (1972), 1114-1118.
157. Gotardo M.A., Monteiro M., “Migration of diethylhexyl phthalate from PVC bags into intravenous cyclosporine solutions”, *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38(4), (2005), 709-713.

158. Faessler D., Mc Combie G., Biedermann M., Felder F., Subotic U., "Leaching of plasticizers from polyvinylchloride perfusion lines by different lipid emulsions for premature infants under clinical conditions", *Internat. J. Pharmac.*, 520, (2017), 119-125.
159. World Health Organization (WHO), "Guidelines for Drinking - water Quality", 3rd ed., (2008), Geneva.
160. Amiridou D., Voutsas D., "Alkylphenols and phthalates in bottled waters", *J. of Hazardous Materials*, 185, (2011), 281-286.
161. Keresztes S., Czégény Z., Tatár E., "Study on the leaching of phthalates from polyethylene terephthalate bottles into mineral water", *Science of The Total Environment*, 458-460 C (2013), 451-458.
162. Pharmacopée Européenne, 8.0, 3.1.5, "Polyéthylène avec additifs pour récipients destinés aux préparations parentérales et aux préparations ophtalmiques".
163. Pharmacopée Européenne, 8.0, 3.1.6: "Polypropylène pour récipients et fermetures destinés aux préparations parentérales et aux préparations".
164. ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), "Connaissances relatives à la réglementation, à l'identification, aux propriétés chimiques, à la production et aux usages des composés de la famille des Phtalates" Rapport d'étude (Tome 1), (2015).
165. Veiga M., Bohrer D., Nascimento P.C., Ramirez A.G., Carvalho L.M., Binotto R., "Migration of phthalate-based plasticizers from PVC and non-PVC containers and medical devices", *J. Brazilian Chem. Soc.*, 23(2012), 72-77.
166. Bagel-Boithias S., Sautou-Miranda V., Bourdeaux D., Tramier V., Boyer A., Chopineau J., "Leaching of diethylhexyl phthalate from multilayer tubing into etoposide infusion solutions", *Am. J. of Health Syst. Pharm.*, 62 (2005), 182-188.
167. Ejlerstson J., Svensson B.H., "Degradation of bis (2-ethylhexyl) phthalate constituents under methanogenic conditions", *Biodegradation*, V.7, (1996), 501-506.
168. Staples C. A., Peterson D. R., Adams W. J., "The environmental fate of phthalate esters: A literature review", *Chemosphere*, 35, (1997), 667-749.
169. Nalli S., Horn O.J., Grochowalski A.R., Cooper D.G., Nicell J.A., "Origin of 2-ethylhexanol as a Voc", *Environ. Pollut.*, 140(1), (2006), 181-185.
170. Hans Günther W., Chrzanowski A., Ottawa N., Hans-Ulrich Häring, Hoffmann A., "Analysis of Plasticizers in Medical Products by GC-MS with a Combined Thermodesorption - Cooled Injection System", *Global Analytical Solutions*, Gerstel (AppNote 6/1996), Germany.
171. Office of Environmental Health Hazard Assessment, "Toxicological profile for Di-(2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP)", September 2009, California Environmental Protection Agency.
172. Sarbach C., Yagoubi N., Sauzieres J., Renaux C., Ferrier D., Postaire E., "Migration of impurities from a multilayer plastics container into a parenteral infusion fluid", *International Journal of Pharmaceutics*, 140 (1996), 169-174.
173. Schwetlick K., König T., "Antioxidant action of phosphite, sulfite and borate esters- A comparison", *Polymer Degradation and Stability*, 24(4), (1989), 279-287.

174. Buchberger W., Stiftinger M., "Analysis of Polymer Additives and Impurities by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry", *Adv. Polym. Sci.*, 248 (2012), 39-68.
175. Dopico-Garcia M.S., Lopez-Vilarino J.M., Gonzalez-Rodriguez M.V., "Antioxidant Content of and Migration from Commercial Polyethylene, Polypropylene, and Polyvinyl Chloride Packages", *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007), 3225-3231.
176. Papanastasiou M., McMahon A., Allen N. S., Doyle A. M., Johnson B. J., Keck-Antoine K., "The hydrolysis mechanism of bis (2,4-di-tert-butyl) pentaerythritol diphosphite (Alkanox P24): An atmospheric pressure photoionisation mass spectrometric study", *Polymer Degradation and Stability*, V.91 (11),(2006), 2675-2682.
177. Haider N., Karlsson S., "Loss and transformation products of the aromatic antioxidants in MDPE film under long-term exposure to biotic and abiotic conditions", *J. Appl. Polym. Sci.*, 85 (2002), 974-988.
178. Mercier J.P., Maréchal E., "Traité des matériaux 13 : Chimie des polymères, synthèses, réactions, dégradations", Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (PPUR), (1996).
179. INRS, "Plastiques, Risque et Analyse Thermique: Polyamide 6", www.inrs.fr/plastiques
180. Ulsaker, G.A., Teien G., "Identification of caprolactam as a potential contaminant in parenteral solutions stored in overwrapped PVC bags", *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 10 (1), (1992), 77-80.
181. Voedsel en Waren Autoriteit, "Screening of Plastic Toys For Chemical Composition and Hazards Market surveillance in the Netherlands", VWA, report ND 05o610/01, (2005).
182. Félix J.S., Isella F., Bosetti O., Nerín C., "Analytical tools for identification of non-intentionally added substances (NIAS) coming from polyurethane adhesives in multilayer packaging materials and their migration into food simulants", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, V.403, (2012), 2869-2882.
183. Bach C., Dauchy X., Chagnon M.C., Etienne S., "Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed", *Water Res.*, 46 (3),(2012), 571-83.
184. Schttler T., "Human exposure to phthalates via consumer products", *Int. J. Androl.*, 29, (2006), 134-139.