

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
Faculté de Technologie  
Département de Génie des Procédés

**Mémoire de fin de cycle**  
**En vue de l'obtention du diplôme de Master en**  
**Génie des procédés.**  
Option : Science et Technologie du Médicament.



Réalisé par :

- M<sup>elle</sup> ABBAS Salima.
- M<sup>elle</sup> BAICHE Fahima.

Président de jury :

- M<sup>r</sup> REZGUI Farouk

Examinatrice :

- M<sup>me</sup> BOUCHERBA Nawel

Promotrices :

- M<sup>me</sup> BOUCHAL Fatiha
- M<sup>me</sup> AYACHI Nabila

# Remerciement

*Nous remercions Dieu pour nous avoir donné le courage et la volonté de réaliser ce travail.*

*Nous remercions chaleureusement notre promotrice M<sup>me</sup> BOUCHAL.F pour l'aide qu'elle nous a apporté et pour son encouragement à finir notre travail.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements à notre Co-promotrice M<sup>me</sup> AYACHI.N maitre assistante à la faculté de médecine à Blida d'avoir encadré ce travail et pour son exigence intellectuelle, ses encouragements et surtout sa patience et sa disponibilité.*

*Un grand remerciement à tous les membres du laboratoire de contrôle qualité de la filiale Antibiotical du groupe Sidal (Médéa), particulièrement à Mr Ahmed, Mr Rabah, Mr Abdeli, M<sup>me</sup> BOUKARA Karima, qui nous a beaucoup encouragé et aidé à finir notre travail.*

*Nos remerciement vont également à M<sup>me</sup> BAKHTI.F, M<sup>me</sup> GAMANA.N et M<sup>me</sup> SADIKI d'avoir nous aidé à réaliser ce modeste travail, et à M<sup>me</sup> KASSKASS la directrice de laboratoire de contrôle qualité, qui nous a permis d'effectuer notre stage.*

*Nos remerciements vont aussi membres de jury qui feront l'honneur de juger notre travail.*

*Nos remerciement vont également au chef du département M<sup>r</sup> KETRANE.R, ainsi à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.*

*Enfin, à tous ceux qui nous ont aidés pour atteindre notre objectif.*

# Dédicace

*Je remercie le bon dieu de nous avoir donnée la volonté pour accomplir ce travail que je dédie tout d'abord.*

*A mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu durant toutes mes longues années des études et leurs sacrifices pour mon bien être, que dieu me les garde.*

*A mes trois chers frères : ACHOUR, NOURDDINE, YAZID et leurs femmes : BARKAHOUM, SABRINA, KARIMA et leurs enfants : CERINE, ALÈSE, et les futures enfants NCHALLAH.*

*A mes très chères sœurs : LOUIZA, ZAKIA, GHANIA, SAMIRA, leurs maris et leurs enfants : SAMIR, WARDA, LYES, CHAHINEZ, TIRIZA, YANIS, FAHIMA, RIAD, LYNA, LOUNIS, AIMAD, et les futures enfants NCHALLAH.*

*A celui que j've partagé ma vie avec lui et qui a été toujours là à mes cotés mon fiancé « LYES », et à son père, sa mère, et toute sa famille.*

*A mes oncles, mes tantes et mes cousines, mes cousins et à toute ma grande famille paternelle et maternelle.*

*A ma binôme FAHIMA et toute sa famille.*

*A ma chère FATIMA qui est ma meilleurs amie depuis l'enfance.*

*A mes chers (es) amis (es) : SALIMA, SAMIRA, KARIMA, SAIDA, SALWA, DJIDA, NADIA, SALIMA, SAMIR, BILLALE, AMRANE ainsi qu'à tous mes camarades.*

Abbas Salima

# Dédicace

*J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail à tous ceux qui me  
sont chers :*

*Je remercie le bon dieu de nous avoir donnée la volonté pour accomplir  
ce travail que je dédie tout d'abord.*

*A la mémoire de mon père qui a toujours était convaincu en mes  
capacités et qui je sens toujours sa présence pour m'encourager. Puisse-  
dieu l'accueillir en son vaste paradis et reposer en paix.*

*A celle qui a donné sa vie pour nous et m'a soutenue dans toutes les  
épreuves de ma vie, ma très chère mère que Dieu me la garde.*

*A mes chers frères : Boubekour, Moussa, Layachi et leurs femmes :  
Leila, Saida et leurs enfants : Fouad, Massilia, Yasmine et ciline.*

*A toute la famille Baiche.*

*A ma binôme Salima et sa famille.*

*A tous mes amis (es) surtout Billaal et Amrane sans en oublier bien sûr  
Hichem.*

**Baiche Fahima**



Liste des figures

# Liste des figures

Figure II.1 : Appareil de dissolution à palette

Figure II.2 : Schéma d'une palette tournante et panier tournant

Figure II.3 : Appareil à flux continu

Figure II.4 : Principe de fonctionnement de l' HPLC

Figure II.5: La courbe de nombre de molécule sortant de la colonne en fonction du temps

Figure II.6 : Courbe d'étalonnage de l'aire en fonction de la masse d'échantillon  $A_e = f(m)$

Figure II.7: Courbe de l'aire  $A$  en fonction de la masse de produit à analysé  $A = f(\Delta m)$

Figure IV.1 : La structure chimique de l'Azithromycine

Figure V.1: Chromatogramme de critère de spécificité pour le standard à 100 %

Figure V.2 : Chromatogramme de critère de spécificité pour le placebo

Figure V.3 : Chromatogramme de critère de spécificité pour le produit fini à 100 %

Figure V.4 : Chromatogramme de critère de linéarité de Standard à 80%

Figure V.5: Chromatogramme de critère de linéarité de produit fini à 80%

Figure V.6 : La courbe de la linéarité du standard représentant l'aire de standard en fonction de concentration [STD]

Figure V.7 : La courbe de la linéarité de produit fini représentant l'air en fonction de concentration [PF]

Figure V.8 : Les chromatogrammes de critère de précision par rapport au standard à dilution 100%

Figure V.9 : Les chromatogrammes de critère de précision par rapport au produit fini à dilution 100%.

Figure V.10 : Chromatogramme de critère d'exactitude pour le Standard à 90%

Figure V.11 : Chromatogramme de critère d'exactitude pour le produit fini à 90%

Figure V.12 : Chromatogramme de Standard de concentration 1 mg / ml

Figure V.13: Le graphe représentant le taux de dissolution en fonction de temps



# Liste des tableaux



## Liste des tableaux

---

Tableau II.1 : Facteurs influençant sur la vitesse de dissolution

Tableau II.2: Les modes de séparation des solutés

Tableau II.3: Les principaux solvants en HPLC

Tableau II.4 : Résumé des différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide

## Partie pratique

### Partie matériel et méthode

Tableau IV.1 : Présentation du médicament Azimycine<sup>®</sup> 200 mg / 5 ml

Tableau IV.2 : Les excipients du médicament Azimycine<sup>®</sup> 200 mg / 5 ml.

Tableau IV.3 : Les propriétés physico-chimique de l'azithromycine

Tableaux IV.4 : Appareillages de laboratoire

Tableaux IV.5: Préparation des solutions filles

Tableaux IV.6: Préparation des échantillons du produit fini

### Résultat et discussion

Tableau V.1 : La spécificité de standard

Tableau V.2 : La spécificité de produit fini Azimycine<sup>®</sup>

Tableau V.3 : La linéarité de standard

Tableau V.4 : La linéarité de produit fini Azimycine<sup>®</sup>

## Liste des tableaux

---

Tableau V.5 : La droite de régression pour le standard

Tableau V.6 : La droite de régression pour le produit fini

Tableau V.7 : Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 pour le standard

Tableau V.8 : Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 pour le produit fini Azimycine<sup>®</sup>

Tableaux V.9: Test d'homogénéité des variances pour le standard

Tableaux V.10: Test d'homogénéité des variances pour le produit fini

Tableaux V.11 : Test d'existence d'une pente significative pour le standard

Tableaux V.12: Test d'existence d'une pente significative pour le produit fini

Tableaux V.13 : Test de validité de la droite de régression pour le standard

Tableaux V.14 : Test de validité de la droite de régression pour l'échantillon de produit fini Azimycine<sup>®</sup>

Tableaux V.15 : Tableau récapitulatif de la linéarité du principe actif (standard) Azithromycine

Tableaux V.16 : Tableau récapitulatif de la linéarité de produit fini Azimycine<sup>®</sup>

Tableau V.17 : La précision du standard

Tableau V.18: La précision de produit fini Azimycine<sup>®</sup>

Tableau V.19 : Homogénéité des variances pour le standard

Tableau V.20: Homogénéité des variances pour le produit fini

Tableau V.21 : Résultats de calcul de variances de répétabilité, intergroupe, reproductibilité, et coefficient de variance et moyenne générale pour le standard

Tableau V.22 : Résultats de calcul de variances de répétabilité, intergroupe, reproductibilité, et coefficient de variance et moyenne générale pour le produit fini

Tableau V.23 : Résultats de l'exactitude de standard

Tableau V.24 : Résultats de l'exactitude de produit fini

## Liste des tableaux

---

Tableau V.25 : Homogénéité des variances de standard

Tableau V.26: Homogénéité des variances de produit fini

Tableau V.27: Test de validité des moyennes pour le standard

Tableau V.28: Test de validité des moyennes pour le produit fini

Tableau V.29 : Estimation de recouvrement moyen pour le standard

Tableau V.30 : Estimation de recouvrement moyen pour le produit fini

Tableau V.31 : Résultats de la limite de détection et de quantification de standard.

Tableau V.32 : Un tableau représentant le dosage de produit fini par HPLC après le test de dissolution pour des temps distincts.

Tableau V.33 : Un tableau représentant le dosage de standard (témoin) par HPLC.

Tableau V.34 : Un tableau représentant les résultats de calcul de taux de dissolution a des temps distincts.

Tableau V.35: Application des méthodes d'analyses sur le produit fini Azimycine<sup>®</sup>.



# Liste des abreviations

# Liste des abréviations :

AMM : Autorisation de la Mise sur le Marché.

PA : Principe Actif.

UV-Visible : Ultra-violet Visible.

IR : Infrarouge.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

CV: Coefficient de Variance.

DCI: Dénomination Commune International.

HPMC: Hydroxy Propyl Methyl Cellulose.

ORL: Oto Rhino Laryngologie

USP : United States Pharmacopeia (pharmacopée américaine).

STD : Standard.

PF : Produit Fini.

éch : échantillon.

Aire (STD) : Aire de standard.

Aire (ech) : Aire d'échantillon (produit fini Azimycine<sup>®</sup>).

tr : temps de rétention.

F<sub>s</sub> : Facteur de système.

LD : Limite de Détection.

LQ : Limite de Quantification.

Moy : Moyenne.

F : Test de Fisher.

DDL: Degré de Liberté.

t : Test de student.

C : Test de Cochran.

J : Jour.

E : Essai.

$\sigma$  : Écart type.

$SCE_L$  : Somme des carrés des écarts intergroupe.

$SCE_r$  : Somme des carrés des écarts intragroupe.

$SCE_t$  : Somme totale.

Titre (%): Titre massique du standard en pourcentage.

PM : Poids Moyen du contenu de poudre.

HEPT : Hauteur Equivalente de Plateaux Théoriques.



# Sommaire

# Sommaire

Introduction générale.....	1
<b>Partie théorique</b>	
<b>Chapitre I : Les antibiotiques</b>	
I.1. Définition de l'antibiotique.....	2
I.2. Classification des antibiotiques.....	2
I.3. Les principales familles d'antibiotiques.....	3
I.4. L'Azithromycine.....	5
<b>Chapitre II : Les techniques expérimentales</b>	
II.1. Les contrôles pharmacotechniques.....	6
II.2. Les contrôles biopharmaceutiques.....	6
II.2.1. Définition de dissolution.....	6
II.2.2. vitesse de dissolution.....	7
II.2.3. Essai de dissolution des formes solides.....	8
II.2.4. Influence de la dissolution sur l'absorption.....	10
II.3. Les contrôles physico-chimiques.....	10
II.3.1. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge IR.....	11
II.3.2. Spectrophotométrie d'absorption dans l'UV- visible.....	11
II. 3.3. Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC).....	12
II.3.3.1. Principe.....	12
II.3.3.2. Les notion de base en HPLC.....	13
II.3.3.3. Appareillage.....	16
II.3.3.4. Application de la chromatographie à l'analyse.....	18
II.3.3.5. Domaine d'application d' HPLC.....	23



## Chapitre III : La validation des méthodes d'analyses

III.1. Définition.....	24
III.2. Objectif.....	24
III.3. Les Critères de validation.....	24
III.4. Procédure de validation.....	28
III.5. Etude statique.....	29
III.6. Etude de la linéarité.....	32
III.7. Etude de la fidélité.....	36

## Partie pratique

### Chapitre IV : Matériel et méthode

I. Matériel.....	38
I.1. Matière.....	38
I.1.1. Présentation du médicament Azimycine <sup>®</sup> 200 mg / 5 ml.....	38
I.1.2. Présentation de principe actif Azithromycine.....	41
I.1.3. Réactifs.....	43
I.2. Equipements.....	43
I.2.1. Appareil de chromatographie HPLC .....	43
I.2.2. Equipements de contrôle biopharmaceutique.....	43
I.2.3. Autre équipements.....	43
II. Méthode.....	44
II.1. Validation analytique de la méthode de dosage de standard et de produit fini Azimycine <sup>®</sup> .....	44
II.1.1. Les conditions opératoires .....	44
II.1.2. Principe de dosage.....	44
II.1.3. Préparation des solutions pour les critères de validation.....	44
II.1.4. La formule de calcul pour le dosage de l'Azithromycine (%).....	48
II.2. Validation biopharmaceutique de la méthode de dissolution de produit fini Azimycine <sup>®</sup> .....	48
II.2.1. Les conditions opératoires.....	48
II.2.2. Principe de la méthode de dissolution.....	49
II.2.3. Préparation des solutions.....	49
II.2.4. Formule de calcul pour le taux de dissolution (%).....	49
II.2.5. Contrôle analytique et biopharmaceutique du produit fini Azimycine <sup>®</sup> .....	50

## **Chapitre V : Résultat et discussion**

I. Validation analytique de la méthode de dosage de standard et de produit fini.....	51
I.1. La spécificité .....	51
I.2. La linéarité du standard et du produit fini Azimycine <sup>®</sup> .....	54
I.3. La précision du standard et du produit fini.....	65
I.4. L'exactitude du standard et échantillon (Azimycine <sup>®</sup> ).....	70
I.5. La limite de détection et de quantification.....	75
I.6. Application de dosage par HPLC sur le produit fini.....	76
II. Validation biopharmaceutique de produit fini Azimycine <sup>®</sup> .....	77
II.1. Formule de calcul pour le taux de dissolution.....	78
II.2. Contrôle analytique et biopharmaceutique du produit fini Azimycine <sup>®</sup> .....	80
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>81</b>

### **Référence bibliographiques**

### **Annexes**



# Introduction générale

## Introduction générale

Le secteur de la santé publique est un secteur particulièrement compliqué et délicat. Il se présente comme un système composé de plusieurs volets interactifs. Le médicament constitue à ce titre le volet le plus appréciable. Chaque produit fabriqué dans l'industrie doit infliger différentes analyses durant les étapes de fabrication. Ces analyses visent à mieux faire apparaître les bienfaits et les inconvénients du produit analysé. Pour mieux garantir la qualité des analyses et satisfaire les exigences réglementaires de la santé, la validation de l'ensemble des méthodes analytiques utilisées est incontournable. La formation théorique et pratique est bâtie autour de la mise au point concrète des méthodes analytiques, leur validation, leur mise en œuvre et l'interprétation des résultats. Le dosage analytique et la dissolution d'un certain nombre de médicaments exige comme pour la détermination des paramètres chimiques et biochimiques, une validation des méthodes du dosage mises en œuvre et la qualification des équipements utilisés à cet effet.

Notre travail, entièrement réalisé au niveau du laboratoire contrôle qualité du complexe Antibiotical de Médéa du groupe Sidal, consiste en «La validation analytique et biopharmaceutique d'une suspension à base d'un antibiotique « Azithromycine » par la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) ». Le dosage analytique et le test de dissolution doivent être dans les normes afin d'obtenir une autorisation de mise sur le marché. Cette exigence de validation est pratiquement courante dans le domaine industriel, où toute nouvelle méthode décrite dans un dossier d'autorisation de mise sur le marché, doit être accompagnée d'une validation complète.

Ce mémoire est scindé en deux parties :

- Une partie de synthèse bibliographique qui comprend :
  - Le premier chapitre : Les antibiotiques ;
  - Le second chapitre : Les techniques expérimentales ;
  - Le troisième chapitre : La validation des méthodes d'analyses.
- Une partie expérimentale subdivisée en matériel et méthodes puis résultats et discussions.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale.



# Partie théorique



# **Chapitre I: Les antibiotiques**

### I.1. Définition de l'antibiotique

C'est toute substance chimique produite par un microorganisme susceptible d'être obtenue par synthèse et qui à la propriété soit d'inhiber la croissance bactérienne en bloquant leur métabolisme par perturbation de la synthèse protéique (Bactériostatique), soit de les tuer par destruction de leur structure membranaire (Bactéricide) [1].

### I.2. Classification des antibiotiques

Le nombre et l'importance des antibiotiques sont tels que, de nombreuses classifications ont été proposées elles reposent sur :

#### ❖ Le spectre d'activité

- ✓ Antibiotique à large spectre.
- ✓ Antibiotique à spectre étroit.
- ✓ Antibiotique à moyen spectre.

#### ❖ Origine

La plupart sont produits par les actinomycètes.

- ✓ Actinomycète 60%.
- ✓ Champignons 16%.
- ✓ Végétaux vert 14%.

#### ❖ Le mode d'action

On peut grouper les antibiotiques en fonction de leur mode d'action au niveau de la cellule (Paroi, membrane, acide nucléique, protéine etc..).

#### ❖ Classification chimique

C'est la classification qui est la plus utilisée. Les antibiotiques sont des molécules chimiques, ils ont une structure chimique et peuvent appartenir aux familles des corps chimiques [1].

### I.3. Principales familles d'antibiotiques

Parmi les principales familles d'antibiotique on cite :

#### I.3.1. Les pénicillines ou $\beta$ lactames

La pénicilline est l'un des rares antibiotiques produits par des moisissures qui n'est pas toxique et utilisés en thérapeutique.

Les antibiotiques  $\beta$  lactames appartiennent à une large classe d'antibiotiques qui comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines et tout antibiotique qui contient un noyau  $\beta$  lactame dans sa structure moléculaire.

Des variations au niveau de la chaîne latérale naturelle ou greffée permettant de modifier les propriétés de la molécule antibiotique [1].

#### I.3.2. Les phénicolis

Le chloramphénicol est extrait à l'origine de streptomycines, il est maintenant obtenu par synthèse, il est bactériostatique pour des nombreuses espèces Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>.

Le chloramphénicol est l'antibiotique des salmonelles et des infections graves [1].

#### I.3.3. Les macrolides

Les plus importants sont l'érythromycine et la spiramycine, ce sont des antibiotiques produits par des streptomycines. Leur structure comporte un grand cycle de lactone. Ils diffèrent par la nature d'un sucre qu'est greffé au cycle. Ils ont tous un même spectre d'activité et même mode d'action. Ils sont faiblement toxiques, ils peuvent remplacer la pénicilline chez les sujets qui sont allergiques ou encore chez les femmes enceintes. Ces antibiotiques sont actifs sur certaines bactéries Gram positif. Ils sont indiqués dans les infections du nez, de la gorge et des oreilles, ainsi que les infections des bronches et des poumons, de la peau, des organes génitaux et de la bouche [1,2].

### 1. Propriétés chimiques

Les macrolides peuvent être synthétisés par condensation de molécules d'acétate, la structure finale est caractérisées par un anneau macrocyclique de type lactone (d'où le nom macrolide) sur le quel s'attachent en général deux sucres substitués. Le cycle lactone est constitué de 14 atomes (13 carbones et 1 oxygène) pour l'érythromycine [2].



### 2. Mode d'action des macrolides

Les macrolides (des bactériostatiques) à chaîne 14 ou 16 carbones altèrent la synthèse des protéines bactériennes en se fixant sur les ribosomes (sous-unité 50S ; et donc blocage par encombrement stérique). Les macrolides sont éliminés au niveau de la bile. L'activité des macrolides est augmentée à un pH alcalin, parce que la pénétration de ces bases faible à travers la paroi bactérienne est meilleure lorsqu'elles sont ionisées [2].

### 3. Spectre d'activité

L'érythromycine est principalement activée contre les bactéries suivantes :

➤ **Gram positif**

Staphylocoques, corynébactéries, et certaines espèces de clostridium et de mycobactéries.

➤ **Gram négatif**

Brucella suis, et Bordetella pertussis [2].

### 4. Membres de ce groupe

Il existe plusieurs types de macrolides avec 14, 15 ou 16 atomes dans leur macrocycle. On les classe parfois en diverses générations :

➤ **1<sup>re</sup> génération**

Cycle à 14 : Erythromycine A

Cycle à 16 : Spiramycine

➤ **2<sup>ème</sup> génération**

Cycle à 14 : Josamycine

Cycle à 14 : Clarithromycine

Cycle à 14 : Roxithromycine

Cycle à 15 : Azithromycine

Cycle à 16 : Midécamycine

➤ **3<sup>ème</sup> génération (kétolides)**

Cycle à 14 : Télithromycine

### **I.4. Azithromycine**

L'Azithromycine est le premier antibiotique macrolide du groupe azalides. Il est dérivée de l'érythromycine par addition d'un atome d'azote dans le cycle lactone de l'érythromycine A, rendant ainsi cet anneau lactone un anneau à 15 atomes. Il est pratiquement insoluble dans l'eau. Il s'utilise pour soigner certains types d'infections causées par des bactéries, son action est d'empêcher les bactéries à produire des protéines qui leur sont essentielles. Sans ces protéines, les bactéries ne peuvent croître, se reproduire ou augmenter en nombre. Il arrête donc la propagation de l'infection, les bactéries restantes sont tuées par le système immunitaire, ou meurent toutes seules [2].



**Chapitre II:**  
**Les techniques expérimentales**

La méthode analytique «Consiste à décomposer l'objet d'étude en allant du plus complexe au plus simple». Elle est aussi un moyen qui exprime concrètement un besoin, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné. Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnés, les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Par rapport à cette dernière, l'objectif d'une méthode analytique peut se résumer en sa capacité à quantifier chacune des quantités inconnues présentes dans un échantillon. Les méthodes d'analyses possibles peuvent être ; physiques, chimiques, ou physico-chimiques, essentiellement les méthodes spectrophotométriques et chromatographiques.

Selon la réglementation et par référence au dossier AMM d'un médicament, les contrôles pharmacotechniques, biopharmaceutiques et physico-chimiques sont indispensables pour valider les produits pharmaceutiques et assurer plus de sécurité au médicament et à son environnement.

### **II.1. Contrôles pharmacotechniques**

Les tests pharmacotechniques sont des tests qui vont permettre de valider le procédé de fabrication et de formulation. Ces tests sont différents selon chaque forme galénique. Pour les poudres et granulés, il existe quatre tests pharmaco-technique :

- ✓ Test de tassement ;
- ✓ Test d'écoulement ;
- ✓ Analyse granulométrique ;
- ✓ Dosage.

### **II.2. Contrôles biopharmaceutiques**

Le test de dissolution, nous permettra d'évaluer la biodisponibilité in vitro du générique par rapport au princeps.

#### **II.2.1. Définition de la dissolution**

La dissolution est le procédé de dispersion moléculaire d'un corps solide, liquide ou gazeux dans un solvant de telle sorte à former un mélange homogène (solution ou suspension stable) [3].

### II.2.2. Vitesse de dissolution

La vitesse de dissolution est la vitesse à laquelle un principe actif se dissout dans un milieu aqueux à partir d'une forme pharmaceutique. Le tableau II.1 présente les facteurs physico-chimiques qui influencent la vitesse de dissolution [4].

**Tableau II.1** : Facteurs influençant sur la vitesse de dissolution

Facteurs	Effets sur la vitesse de dissolution
Surface de contact solide-liquide	La vitesse de dissolution croît avec le degré de division
Viscosité	La viscosité diminue avec la vitesse de dissolution en réduisant la diffusion
Agitation	L'agitation accélère la dissolution en renouvelant le liquide à l'interface
Température	Une élévation momentanée de la température accélère la dissolution L'élévation de la température est contre-indiquée pour les produits volatils et thermolabiles
pH	Dans le cas de la dissolution par ionisation, le pH du milieu est très important (alcaloïdes, phénols, substances amphotères,...)
Polymorphisme à une température Donnée	Un produit est plus soluble à l'état amorphe qu'à l'état cristallin
Substances additives	Les substances ajoutées à un solvant peuvent modifier la solubilité de certain produit

### II.2.3. Essai de dissolution des formes solides

#### 1. Principe

Le test de dissolution est une méthode d'évaluation *in vitro* de la vitesse et du taux de libération du PA pour toutes les phases de développement d'un nouveau médicament, permettant de faire une étude de la cinétique de dissolution d'un médicament quelconque dans un milieu donné. Il est aussi un outil d'évaluation lors d'un développement d'un générique, par la comparaison des profils de dissolution à celui du médicament de référence.

Il est aussi utilisé pour le contrôle de la qualité d'un médicament, pour évaluer l'uniformité et démontrer la stabilité d'une forme pharmaceutique donnée. Le test *in vitro* est une étape préliminaire pour prédire le comportement du médicament *in vivo* et de sa performance (efficacité).

#### 2. Conditions opératoire

Les principales conditions opératoires portent sur le milieu de dissolution, à savoir :

- Le volume et la composition (eau distillée, milieu gastrique ou intestinal artificiels) ;
- La vitesse d'agitation de la palette ou du panier (de 50 à 120 rotations par minute) ;
- Le débit pour la cellule à flux continu;
- Le mode de prélèvement, le nombre d'essais est généralement six et l'intervalle de prélèvement.

#### 3. Milieux de dissolution

Si la solubilité du PA varie peu en fonction du pH, on prend de l'eau pure ce qui facilite le dosage. Si maintenant la solubilité varie en fonction du pH, il faudra prendre alors un milieu gastrique artificiel, puis un milieu intestinal artificiel. Le mieux est de faire varier progressivement le pH de 1,2 à 8,0 qui convient le mieux aux conditions physiologiques [4].

#### 4. Méthode de dissolution

La pharmacopée européenne [5] décrit trois méthodes de dissolution :

##### a) Méthode à palette tournante

Le récipient contenant le milieu de dissolution est en verre borosilicaté. Il est cylindrique à fond hémisphérique. La palette de forme parfaitement définie se trouve dans l'axe du récipient à une distance déterminée du fond. C'est l'appareil qui convient le mieux dans la plupart des cas. L'appareil correspondant à ce type de dissolution est illustré sur la figure II.1



Figure II.1 : Appareil de dissolution à palette

##### b) Méthode à panier tournant

La palette est remplacée par un panier cylindrique grillagé (figure II.2) dans lequel est placée l'unité à essayer. Cette méthode est adaptée pour les formes galéniques qui flottent tel que les gélules et comprimé flottant [4].

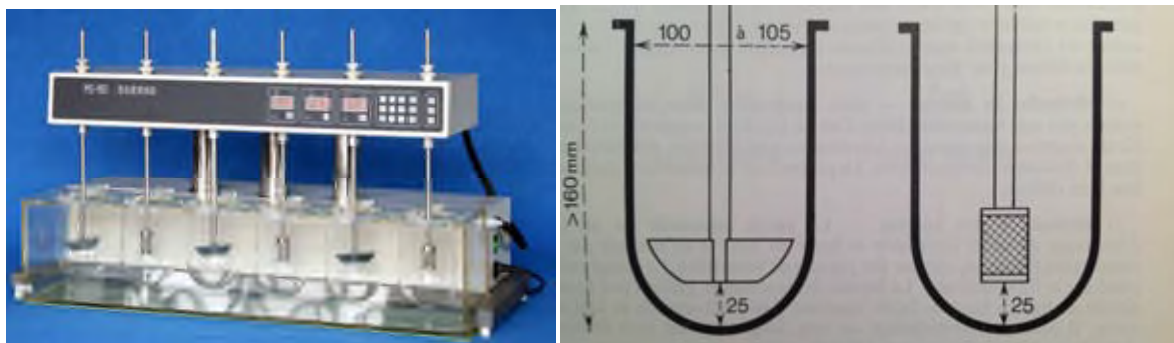


Figure II.2 : Schéma d'une palette tournante et panier tournant

### c) Méthode à cellule à flux continu

Plus rarement, il est possible d'utiliser un appareil à flux continu (figure II.3). Le comprimé est déposé dans une cellule. Une pompe permet de former une pression assez forte pour pouvoir faire traverser le liquide de dissolution de bas en haut à un débit horaire entre 0,3 et 3 litres [5].

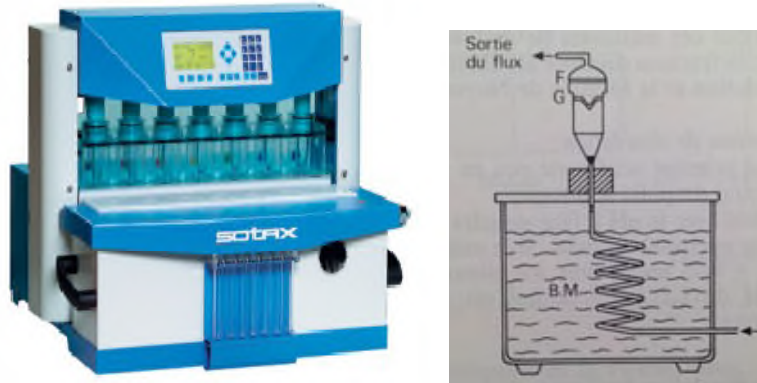


Figure II.3 : Appareil à flux continu

### II.2.4. Influence de la dissolution sur l'absorption

Une substance médicamenteuse ne peut être résorbée que sous forme dissoute faisant l'étape de dissolution un facteur limitant la résorption. Cependant, les formes non ionisées des médicaments ont une faible hydro-solubilité se qui limite la résorption [6].

### II.3. Contrôles physico-chimiques

Le contrôle de matière première est régit par une monographie de la pharmacopée.

Les différents tests effectués sont :

- Tests d'identification des matières premières (Aspect, la solubilité, perte à la dessiccation, cendre sulfurique, spectroscopie infrarouge, dosage de principe actif, spectroscopie d'absorption UV- Visible).
- Tests d'identification de produit fini (Aspect, caractères pharmaco-techniques et biopharmaceutique, dosage par HPLC du produit fini).



### II.3.1. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (IR)

La spectrophotométrie infrarouge est l'un des outils les plus puissants dont dispose le chimiste pour identifier les composés organiques ou inorganiques purs. Car à l'exception de quelques molécules homo-nucléaires telles que l'O<sub>2</sub>, le N<sub>2</sub> et le Cl<sub>2</sub>, toutes les espèces moléculaires absorbent dans l'infrarouge. De plus, à l'exception des molécules chirales à l'état cristallin, chaque espèce a un spectre d'absorption infrarouge unique.

Pour l'analyse quantitative, la spectroscopie infrarouge est un outil moins satisfaisant que la spectrophotométrie UV/Visible [7].

#### 1. Principe

Le phénomène d'absorption dans le domaine de l'infrarouge est lié aux vibrations de l'énergie de vibration moléculaire. En première approximation, la vibration d'une molécule peut être considérée comme harmonique et décomposée de ce fait en un nombre fini de vibrations simples, dans le cas d'une molécule non-linéaire de N atomes. Ces vibrations qui impliquent une variation du moment dipolaire, créent un champ électromagnétique périodique qui absorbe la radiation électromagnétique de même fréquence, l'intensité d'absorption étant proportionnelle au carré de la vitesse de variation du moment dipolaire [8].

### II.3.2. Spectrophotométrie d'absorption dans l'UV- Visible

La spectrophotométrie d'adsorption dans l'UV/Visible est l'une des méthodes d'analyse de la spectroscopie moléculaire. C'est une technique basée sur l'absorption des radiations lumineuses par la matière dans le domaine s'étendant du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1100 nm. Cette partie du spectre est désignée par l'UV/ Visible, parce qu'elle englobe les radiations perceptibles par l'œil humain [9].

#### 1. Principe

Le principe de la spectroscopie UV- visible repose sur la transition d'un état fondamental vers un état excité, d'un électron d'une molécule, due à l'excitation par une onde magnétique [10].

Le domaine spectral est divisé en trois plages de longueur d'onde appelées proche UV (185- 400 nm), visible (400-700 nm) et très proche infrarouge (700- 1100 nm).

L'origine de l'absorption lumineuse est due à l'interaction des photons incidents avec les espèces de l'échantillon. Ainsi lorsqu'une molécule isolée absorbe un photon de l'UV/Visible, l'énergie d'un ou plusieurs électrons de valence se trouve accrue en entraînant des perturbations.

### II.3.3. Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (CLHP)

La chromatographie liquide à haute pression (le terme haute performance est également employé), elle est souvent appelée du nom de son abréviation CLHP, ou HPLC (High performance liquid chromatography) en anglais [11].

Cette chromatographie est une technique de séparation analytique et préparative des molécules, elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un composé ou un mélange de composés. Elle dérive d'ancienne chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées [12].

L'HPLC est une technique analytique en croissante évolution pour l'analyse des médicaments. Sa simplicité, haute spécificité et large intervalle de sensibilité, font que cette méthode soit l'idéale pour le dosage des formes pharmaceutiques et des fluides biologiques [13].

#### II.3.3.1. Principe

La chromatographie liquide haute performance est une technique utilisée pour séparer des composés chimiques dans un mélange. Son principe repose sur la séparation de ces composés dans une colonne contenant du gel de silice, appelée phase stationnaire, par pompage d'un solvant, appelée phase mobile, à travers la colonne selon l'affinité unique de chaque composant existant entre la phase mobile et stationnaire. Les composés migrent le long de la colonne à différentes vitesses et ressortent à différents temps, établissant ainsi une séparation du mélange. Les composés qui ont une grande affinité envers la phase mobile migrent plus rapidement vers le bas de la colonne, tandis que ceux qui ont une grande affinité envers la phase stationnaire migrent lentement [14].

### II.3.3.2. Notions de base en HPLC

Un système chromatographique est composé de :

- Soluté (éluant, substrat).
- Phase mobile (éluant, solvant).
- Phase stationnaire (support).

#### 1. Soluté

##### a) Définition

C'est la substance existant dans un échantillon, qui est séparée par élution. Celle-ci est suivie selon un protocole bien précis, de sorte à avoir une affinité du soluté vis-à-vis de l'une des deux phases.

##### b) Mode de séparation des solutés

Les techniques de chromatographie peuvent être classées, en fonction du mécanisme de séparation (**Tableau II.2**) des solutés retenus au niveau de la phase stationnaire [15].

**Tableau II.2** : Modes de séparation des solutés

Mode de chromatographie	Principe de rétention
Adsorption	Polarité
Partage	Solubilité (affinité)
Echange ionique	Charge
Affinité	Spécificité biochimique ou chimique (nucléophilie, acidité, basicité, ect)
Exclusion moléculaire	Forme des molécules et poids relatifs à des dimensions moléculaires du même ordre que la taille des pores de la phase stationnaire

### 2. La phase mobile

#### a) Définition

La phase mobile est un vecteur liquide (pour HPLC) servant le soluté à travers la phase stationnaire. La préparation se produit suivant un protocole (tampon + solvant) selon la molécule du composé à analyser.

Les solvants utilisés (**Tableau II.3**) ont des combinaisons miscibles d'eau et de divers liquide organique.

La solution (phase mobile) préparée doit être agitée, filtrée, et dégazée [16].

**Tableau II.3:** Principaux solvants en HPLC

Phénomène	Solvants
Adsorption	Hexane, méthanol, acétonitrile, dichlorométhane, chloroforme, éther de pétrole
Partition	Méthanol, acétonitrile
Echange d'ions	Solution tampon (pH contrôlé) aqueuse
Exclusion	Tétrahydrofurane, toluène

### 3. La phase stationnaire

#### a) Définition

La phase stationnaire est un support plus au moins poreux (silice ou polymère) recouvert ou non d'un liquide, qui par ses affinités avec le soluté, va permettre la séparation des constituants d'un mélange au cours de leurs entrainement par la phase mobile.

Cette séparation est gouvernée par plusieurs phénomènes, qui seront résumés sur le tableau III.4, ci-après:

**Tableau II.4 :** Résumé des différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide [17]

La phase stationnaire	Mode de chromatographie	Caractéristiques de la phase stationnaire	Principe de rétention et d'éluion des solutés
Liquide	Partage	Liquide fixé sur un support inerte (terre diatomée, polymère) ou non inerte (gel de silice...) par greffage ou imprégnation	Solubilité : distribution des composants du mélange à séparer dans les deux phases liquide selon leurs coefficients de partage
Solide	Adsorption	Adsorbant solide	Polarité : phénomène de surface c'est-à-dire formation de liaisons spécifiques entre les composants et la surface absorbante
	Echange d'ions	Résine (polymères porteuse de groupements chargés négativement ou positivement)	Charge : interactions électrostatiques avec les composants de charges opposées
	Affinité	Support sur le quel est greffée une molécule (le ligand) spécifiquement reconnue par l'un des composants de l'échantillon à analyser	Spécificité biochimique: déplacement de l'équilibre de liaison (molécule-ligand greffé) en faveur de l'équilibre
	Exclusion moléculaire	Solide poreux	Les composants de diamètre supérieur à des pores des billes du support sont « exclus » et ceux de diamètre inférieur y diffusent et sont freinés

### b) Types de phases stationnaires

La chromatographie de partage est la plus usuelle et permet la mise en œuvre de deux types de phase stationnaire :

#### ➤ La phase normale

La phase normale est celle dont la quelle les molécules greffées sur le gel de silice ont un groupement polaire. Il faut donc utiliser un éluant (la phase mobile) très peu polaire ou apolaire. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

#### ➤ La phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones ( $C_8$  et  $C_{18}$ ). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (mélanges : eau-méthanol ; eau-acétonitrile; eau-Tétrahydrofurane). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante [17].

#### ❖ Exemple de phases stationnaires par greffage sur silice

- Amine :  $-(CH_2)_3-NH_2$  (polarité forte) ;
- Nitrile :  $-(CH_2)_n-C \equiv N$  (polarité moyenne) ;
- Alkyle:  $-(CH_2)_{17}-CH_3$  (apolaire) « Colonne C18 ».

### II.3.3.3. Appareillage

#### 1. Différents organes de HPLC

L'installation de l'HPLC nécessite un assemblage d'organes bien spécifiques afin d'avoir une bonne séparation des constituants. Elle est composée des éléments suivants :

- Un four dans lequel se met une colonne qui contient la phase mobile ;
- Un module dans lequel se fait l'injection automatique, une vanne d'injection pour l'injection manuelle ;

- Un système de pompage à deux pistons, munit d'un filtre qui communique avec le réservoir des éluant (solvants) ;
  - Un dégazeur ;
  - Un détecteur à UV-visible ;
  - Une unité de pilotage par ordinateur et d'impression, pour traitement des données et enregistrement des chromatogrammes (un contrôleur) ;
- (Voir l'annexe 10: Appareil de l'HPLC pour l'injection automatique).

### 2. Principe de fonctionnement

Au départ, le mélange à séparer est déposé en une couche mince au sommet d'une colonne, là où s'entasse la phase stationnaire sous forme de particules de petite taille.

L'échantillon à analyser est poussé par un débit élevé de la phase mobile, ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ainsi, le mélange à séparer se déplace progressivement vers le haut, à grande vitesse et sous une très forte pression.

En descendant, ils tendent à se séparer quand ils atteignent l'extrémité inférieure de la colonne. A cet endroit, la phase mobile traverse un dispositif de détection qui permet de déceler la présence des composés dans la phase mobile, et de tracer un chromatogramme (évolution des pics à une longueur d'onde donnée dans UV-Vis, en fonction du temps). Les pics obtenus sont plus étroits, donc la séparation de la solution est améliorée. Le seuil de détection est également plus bas [18].

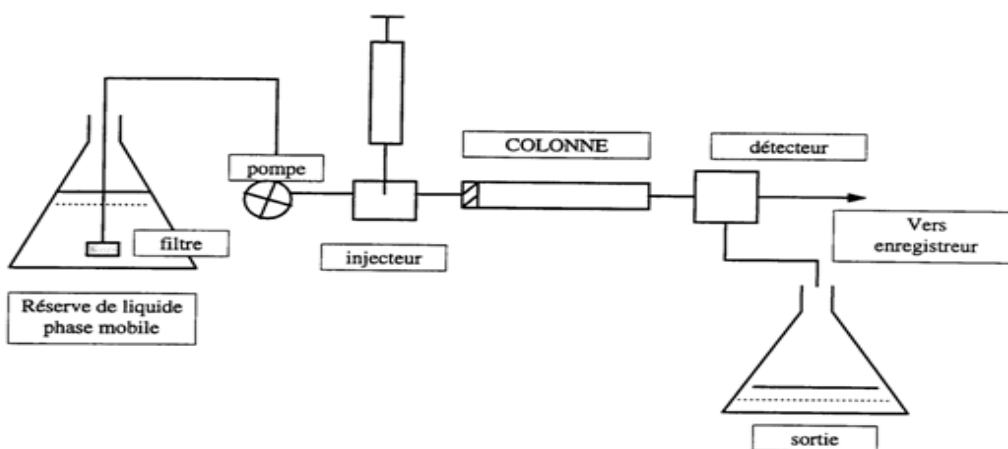


Figure II.4 : Principe de fonctionnement de l'HPLC

### II.3.3.4. Application de la chromatographie à l'analyse

#### 1. Analyse des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.



Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible.

La composition de la phase mobile est un paramètre particulier à la HPLC. Il faut donc préciser pour chaque analyse :

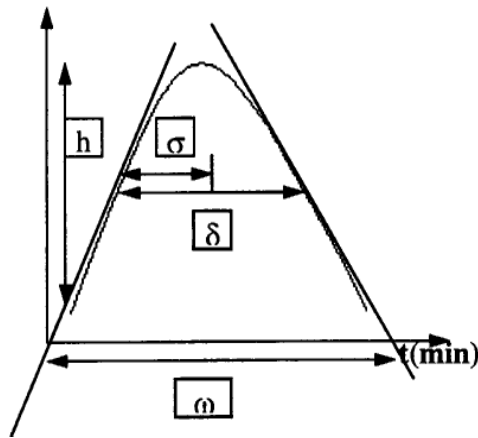
- Le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support...
- La nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, débit, mode de détection  $\lambda$  en nm.
- La quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc....

#### 1.1. Analyse quantitative

L'analyse quantitative consiste à **doser**, c'est-à-dire déterminer la concentration d'un ou de plusieurs composés du mélange inconnu, une fois que ces composés ont été identifiés. La méthode repose essentiellement sur la détermination de la **surface** (parfois la hauteur) des pics. Ensuite, selon les besoins de l'expérimentateur, on pourra soit déterminer les pourcentages relatifs des constituants du mélange, soit déterminer la concentration d'un composé du mélange par la méthode de la courbe d'étalonnage ou par la méthode du standard interne.



Le temps de rétention ( $t_r$  en min) est une caractéristique de chaque soluté dans les conditions opératoires fixées. On peut comparer le  $t_r$  de deux solutés en définissant :



**Figure II.5 :** Courbe de nombre de molécule sortant de la colonne en fonction du temps

a) **le facteur de sélectivité  $\alpha$  entre les deux solutés :**

$$\alpha = \frac{tr_2}{tr_1} \longrightarrow \boxed{tr_2 > tr_1}$$

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} \quad \text{avec : } K_1, K_2 \text{ sont des coefficients de partage.}$$

- Si  $\alpha = 1$  : les pics coïncident.
- Si  $\alpha = 1,05$  : la séparation est possible.

b) **L'efficacité d'une colonne qui est mesurée en nombre de plateau théorique (L'efficacité) :**

$$\boxed{N = \left(\frac{tr}{\sigma}\right)^2 = 5,54 * \frac{tr^2}{\delta^2} = 16 * \frac{tr^2}{w^2}}$$

Plus que le nombre de plateaux théorique est grand, plus la séparation est meilleure. Cette valeur mesure la finesse du pic. A partir de cette valeur peut être calculée la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), qui permet de comparer des colonnes de longueur différente :

$$\boxed{HEPT = L / N}$$

HEPT : hauteur équivalente de plateaux théoriques.

N : nombre de plateaux théoriques.

L : hauteur de colonne.

w : largeur du pic (unité de temps).

$\delta$ : largeur du pic à mi-hauteur.

$\sigma$  : écart type : distance entre le point d'inflexion (point où la dérivée seconde s'annule) et la moitié de la courbe.

c) **Résolution de la colonne (R) pour la séparation de deux solutés bien déterminés :**

Ce facteur R est calculé à partir de chromatogramme pour traduire numériquement la plus au moins bonne séparation entre deux composés.

$$R = 2 \times \frac{(tr_2 - tr_1)}{(w_1 + w_2)}$$

**Tel que :**  $w_1$  : largeur du pic 1.

$w_2$  : largeur du pic 2.

$tr_1$  : Temps de rétention du composé 1.

$tr_2$  : Temps de rétention du composé 2.

- Si  $R < 1$  : mauvaise séparation donc les paramètres appliqués à la colonne ne sont pas les bons.
- Si  $R > 1$  bonne séparation :
  - ✓ Si  $1 < R < 1,5$  : résolution acceptable.
  - ✓ Si  $1,5 < R < 1,6$  : résolution optimale.
  - ✓ Si  $R > 1,6$  : résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé.

## 1.2. Analyse qualitative

L'analyse qualitative consiste à **identifier** un ou plusieurs composés du mélange inconnu injecté. Pour ce faire, il faut posséder des échantillons standards des composés soupçonnés dans le mélange.

Pour un ensemble de paramètres donné (débit de gaz vecteur, température du four, ect), chaque composé est caractérisé par son **temps de rétention  $t_r(\text{min})$**  :

$$t_r = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{vitesse de déroulement du papier}}$$

Le temps de rétention d'un composé représente le temps que prend le composé pour traverser la colonne chromatographique. La distance parcourue par le composé se calcule à partir du moment de l'injection jusqu'à son apparition au détecteur, mesurée au sommet du pic sur le chromatogramme.

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

- **Méthode de l'étalonnage externe**

Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage  $\text{Aire} = f(\text{masse ou concentration du produit})$ , pour un volume injecté constant  $V$ . L'injection ultérieure du même volume  $V$  de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire **qu'une mesure** avec l'étalon et à utiliser une règle de trois :

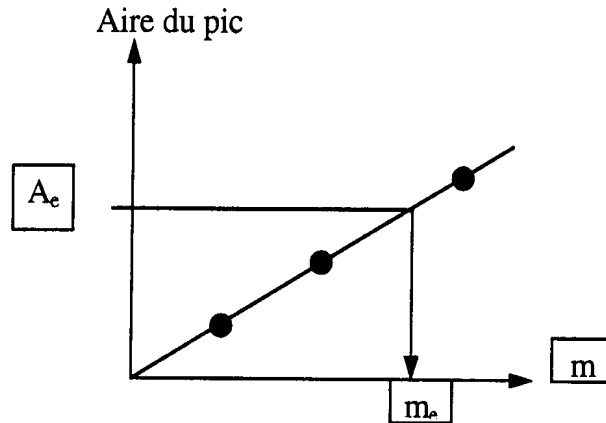
$$A_e/m_e = A_{et}/m_{et}$$

Avec : A: Aire des pics.

e : échantillon.

et : étalon.

m : masse du produit remplaçable par la concentration.



**Figure II.6:** Courbe d'étalonnage de l'aire en fonction de la masse d'échantillon  $A_e=f(m)$

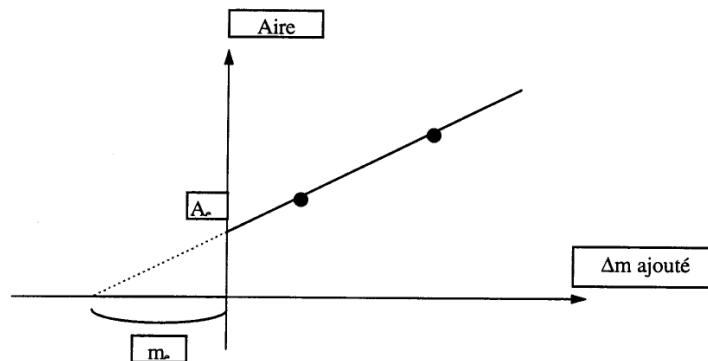
- **Méthode des ajouts :**

Comme la précédente, cette méthode nécessite de posséder une masse  $m$  de produit à analyser pur. Après avoir analysé l'échantillon, on ajoute à celui-ci des quantités connues  $\Delta m$  du produit avant de le chromatographier à nouveau (faire au minimum deux ajouts), ce qui entraîne une variation de l'aire du pic  $\Delta A$ .

Si  $m$  est la masse de produit à analyser,  $A$  est l'aire d'échantillon :

$$\left( \frac{\Delta A}{\Delta m} \right) = A/m \text{ soit } m = A \cdot \left( \frac{\Delta m}{\Delta A} \right) \text{ et } A = \left( \frac{\Delta A}{\Delta m} \right) \cdot m$$

Si le produit ajouté est en solution, il faut tenir compte des effets de dilution [19].



**Figure II.7:** Courbe de l'aire  $A$  en fonction de la masse de produit à analyser  $A = f(\Delta m)$

### II.3.3.5. Domaine d'application de l' HPLC

La chromatographie a produit un effet pour le moins explosif dans le monde scientifique, si bien qu'elle connaît aujourd'hui des applications dans tous les secteurs où les sciences comme la biochimie, chimie analytique et la biologie sont présentes, notamment au niveau de l'industrie pharmaceutique, clinique, alimentaire, l'industrie des polymères et le secteur de la protection de l'environnement [20].



Chapitre III:  
La validation des méthodes d'analyses

Le contexte industriel actuel impose à de nombreuses entreprises de démontrer que l'ensemble des procédés et méthodes utilisées dans l'élaboration d'un produit manufacturé conduisent effectivement aux résultats recherchés.

L'industrie pharmaceutique n'échappe à cette règle et les laboratoires sont tenus de prouver que les méthodes d'analyses employées sont parfaitement valides.

La validation est une opération destinée à démontrer que le procédé et toute procédure utilisée pour l'analyse d'un produit conduite effectivement aux bons résultats.

### III.1. Définition

La validation d'une méthode analytique (physique, chimique, physico-chimique) est un ensemble des activités de vérification, elle consiste à déterminer certaines caractéristiques du dosage d'une substance dans un substrat, elle est indispensable afin de garantir la fiabilité et la traçabilité des résultats fournis [21].

### III.2. Objectif

Cette procédure a pour but de démontrer que tout procédé ou procédure utilisés, pour l'analyse d'un produit conduisent effectivement au bon résultat (contrôle de la matière première, article de conditionnement et les produits finis).

L'objectif de la validation, n'est pas de comparer une méthode à une autre préexistante (méthode de référence), mais de mieux connaître ses caractéristiques [21].

### III.3. Les Critères de validation

La validation recouvre plusieurs critères de qualité, qui peuvent être classés en critères fonctionnels (sensibilité, sélectivité ou spécificité) et en critères statistiques (linéarité, justesse, précision ou fidélité, exactitude, limite de détection, limite de quantification). Ces paramètres garantissent l'aptitude de la méthode à donner des résultats exacts, et constants dans les conditions opératoires fixés par le laboratoire de mise au point. La robustesse permet

d'étudier le transfert de la méthode vers d'autres laboratoires que celui où elle a été élaborée, les différences de matériel et de savoir faire existant d'un laboratoire à un autre pouvant entraîner des variations des résultats obtenus [21].

### III.3.1. Spécificité

La détermination de la spécificité permet de s'assurer que le signal mesuré dans les conditions opératoires retenues, provient seulement de la substance à analyser, c'est-à-dire qu'il n'existe pas d'interférences provenant des excipients, et/ou des produits de dégradation et/ou des impuretés [19].

### III.3.2. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance(s) à étudier dans l'échantillon à analyser.

Le signal mesuré Y s'exprime en fonction de la grandeur à mesurer X par la relation :

$$Y = aX + b$$

L'étude de la linéarité comporte :

- La réalisation d'une gamme d'étalonnage.
- La détermination de l'équation de la droite.
- La vérification de la linéarité [19].

#### - Rôle du domaine de linéarité

Pour que la sensibilité et le blanc aient un sens pratique, il faut que le modèle soit réellement linéaire. Étant donné l'importance de ces deux critères, l'une des premières étapes de validation d'une méthode va donc consister à vérifier cette hypothèse.

L'étendue de domaine de la linéarité peut varier de façon très importante, selon la technique d'analyse employée [22].



### III.3.3. Sensibilité

C'est la capacité d'une méthode d'analyse à enregistrer de faibles variations de la concentration. Elle représente la variation minimale qu'il faut imposer à la grandeur mesurée  $x$  (par exemple la concentration) pour obtenir une variation significative du signal mesuré  $y$ . dans le cas d'une méthode donnant une réponse linéaire, la sensibilité est mesurée par la pente de la courbe d'étalonnage [19].

### III.3.4. Justesse

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

La justesse se détermine par l'analyse d'un échantillon reconstitué, dont la teneur en composé à doser est parfaitement connue, ou à partir de référence [23].

### III.3.5. Exactitude

Le terme exactitude comprend le déplacement total d'un résultat par rapport à la référence, dû au hasard, aussi bien qu'aux effets systématiques. L'exactitude exprime donc l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée [23].

### III.3.6. Précision ou fidélité

La fidélité exprime le degré de dispersion existant entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans les conditions prescrites.

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard et n'a aucune relation avec la valeur vraie spécifiée. La fidélité est calculée à partir de l'écart type de résultats d'essais.

Deux mesures de la fidélité, appelées répétabilité et reproductibilité, sont nécessaires pour la description de la variabilité d'une méthode d'analyse.

- **Répétabilité**

Représente la fidélité, de la méthode sous les conditions identiques et la qualité de l'accord entre les mesures répétées (injectée 5 ou 7 fois). Elle est exprimée par l'écart type calculé à partir d'une série de mesures indépendantes, obtenues par un seul opérateur dans un court intervalle de temps, sur un même échantillon dans les mêmes conditions opératoires.

- **Reproductibilité**

Permet l'évaluation de la fidélité de la méthode dans les conditions de l'exploitation des variables :

- Opérateurs différents.
- Différents laboratoires.
- Réactif de différentes origines.
- Dosage réalisé sur plusieurs jours.
- Appareillage provenant de différents fabricants.
- Une série de résultats réalisée sur trois jours avec 5 injections pour chaque jour [19].

### III.3.7. Limite de détection

La limite de détection est la plus petite quantité d'une substance à analyser pouvant être détectée dans un échantillon, mais non nécessairement quantifiée comme exacte. Le seuil de détection est un paramètre des essais limites [19].

### III.3.8. Limite de quantification

La limite de quantification est la plus petite quantité du composé pouvant être dosé par la méthode. C'est un paramètre intervenant dans les analyses quantitatives pour les composés présent à faible concentration, dans des matrices échantillon. Elle est notamment utilisée dans le dosage des impuretés et/ou des produits de dégradations [19].

### III.3.9. Robustesse

La robustesse est la mesure de la dispersion des résultats lorsque l'on impose des variations contrôlées et limitées de part et d'autre des conditions opératoires normales. Ces variations peuvent être des déviations analytiques aléatoires ou introduits de manière fortuite par l'analyste. La robustesse est d'autant plus élevée que le résultat d'analyse dépend moins de ces variations aléatoires.

La robustesse doit être évaluée par rapport à la fidélité. A fin de séparer clairement les tests de robustesse et de reproductibilité [22].

### III.4. Procédure de validation

En pratique, la validation d'une méthode analytique est une démarche longue et délicate qui se fait en 4 phases:

La première phase réalisée à l'aide des échantillons de la substance pure à doser correspondant à la mise au point des paramètres analytiques de base de la méthode. Cette première phase a pour but de démontrer la validité des choix effectués, pour fixer les différents paramètres de la méthode et de permettre sa normalisation. La validation de la phase 1 doit conduire à la rédaction d'un document exposant la méthode d'analyse sans ambiguïté et de manière complète. Toutes les opérations essentielles concernant la conduite de l'essai, les réactifs et les appareils doivent être décrites.

La seconde phase réalisée à l'aide des échantillons de référence manufacturés dans le but est l'étude analytique approfondie des performances et la détermination des paramètres statistiques de la méthode en présence des autres constituants de la formulation étudiée.

Elle a pour but de démontrer l'applicabilité de la méthode à l'usage envisagé. Le cas échéant, si l'étude conduit à des résultats aberrants en termes de linéarité ou de spécificité, la robustesse de la méthode sera étudiée de nouveau afin de mettre en évidence le ou les paramètres qui sont susceptibles d'influencer les résultats.

La troisième phase est réalisée sur lot industriel. Lors de cette phase l'exactitude est étudiée sur un lot industriel, ceci permet d'établir le plan de contrôle et les limites d'acceptation internes intégrant la variabilité éventuelle du produit fini.

La quatrième phase de validation est réalisée sur plusieurs lots industriels. Cette phase est une phase facultative qui doit être entreprise que lorsque l'on craint que la variabilité du processus de fabrication puisse avoir une influence sur les résultats obtenus à l'aide de la méthode de contrôle [24].

### III.5. Etude statique

La validation d'une méthode analytique recouvre des critères statistiques (linéarité, reproductibilité, justesse, fidélité et répétabilité). Ces paramètres garantissent l'aptitude de la méthode à donner des résultats exacts.

Afin d'étudier les critères de validation, on utilise des tests statistiques qui sont des règles mathématiques, permettant à partir des résultats expérimentaux recueillis, organisés, résumés, présentés et analysés, d'en tirer des conclusions et de prendre des décisions judicieuses, avec des risques d'erreurs fixes [25].

#### III.5.1. Tests statistiques

Les tests statistiques permettent essentiellement d'évaluer les répartitions obtenues, pour savoir si elles sont dues au hasard ou si elles recèlent des informations intéressantes. Fisher, Student, Pearson..., autant de noms familiers à tous ceux qui ont manipulé un jour ou l'autre des statistiques ou des probabilités.

Les tests d'hypothèse associés à ces noms de mathématiciens ou de statisticiens sont aujourd'hui très largement utilisés dans de nombreux domaines de recherche [25].

#### 1. Objectifs

Il existe de très nombreux tests qui permettent d'évaluer des aspects différents de significativité.

Les objectifs principaux auxquels peuvent répondre les tests statistiques sont :

- L'évaluation de la représentativité des répartitions observées, par rapport aux valeurs connues pour l'ensemble de la population ;
- La mesure de la significativité de la différence constatée sur les observations de deux groupes d'individus ou d'un même groupe pour deux variables observées ;
- L'existence et l'intensité d'une liaison entre deux variables [25].

### 2. Fonctionnement :

Les tests statistiques fonctionnent tous sur le même principe, qui consiste à énoncer une hypothèse sur la population mère puis à vérifier, sur les observations constatées, si celles-ci sont vraisemblables dans le cadre de cette hypothèse.

Autrement dit, on cherche à estimer la probabilité de tirage au sort dans la population mère, d'un échantillon ayant les caractéristiques observées. Si cette probabilité est minime, on rejette l'hypothèse énoncée ; dans le cas contraire, celle-ci peut être adoptée au moins provisoirement, dans l'attente de validation complémentaire.

L'hypothèse à tester est appelée  $H_0$  ou hypothèse nulle. Elle s'accompagne impératives de son hypothèse alternative appelée  $H_1$ .

Le test s'attachera à valider ou à rejeter  $H_0$  et par conséquent à tirer la conclusion inverse pour  $H_1$ .

Si le résultat du test amène à accepter l'hypothèse nulle  $H_0$ , le chargé d'étude en déduit qu'il ne peut rien conclure à partir des observations concernées.

En revanche, le rejet de  $H_0$  signifie que la répartition des réponses recèle des informations particulières qui ne semblent pas être dues au hasard et qu'il convient d'approfondir [25].

### 3. Mode d'utilisation

La mise en œuvre d'un test statistique se déroule généralement en 4 étapes:

- ✓ Formulation de l'hypothèse nulle  $H_0$  et de son hypothèse alternative  $H_1$  : ces dernières sont toujours formulées par rapport à la population globale, alors que le test portera sur les observations effectuées dans le cadre de l'échantillon.
- ✓ Détermination du seuil de signification du test ( $\alpha$ ).
- ✓ Calcul du seuil de rejet de  $H_0$  pour déterminer la région de rejet et la région d'acceptation de  $H_0$  (et inversement de  $H_1$ ).
- ✓ Décision de rejet ou d'acceptation de l'hypothèse  $H_0$  [25].

### 4. Tests paramétriques et non paramétriques

On distingue deux grandes catégories de tests : les paramétriques et les tests non paramétriques.

Les premiers exigent que l'on spécifie la forme de la distribution de la population mère étudiée. Il peut s'agir, par exemple, d'une distribution suivant la loi normale, ce qui est le cas général lorsqu'on a affaire à des grands échantillons. En général, ces tests ne peuvent s'appliquer qu'aux variables numériques.

Les tests non paramétriques s'appliquent quand à eux, à la fois aux variables numériques et qualitatives. Ces tests ne font pas référence à une répartition particulière de la population mère. Ils peuvent donc s'appliquer à des petits échantillons.

S'ils sont théoriquement moins puissants que les tests paramétriques, on peut quand même considérer que les tests non paramétriques sont plus adaptés aux problématiques d'enquêtes. Des études ont d'ailleurs prouvées que leur exactitude sur de grands échantillons, n'est que légèrement inférieure à celle des tests paramétriques, alors qu'ils sont infiniment plus exacts sur des petits échantillons [25].

### 5. Erreurs-types

La conclusion retenue (rejet ou non de l'hypothèse  $H_0$ ) est établie avec une certaine probabilité d'erreur.

Lorsque le test conduit à rejeter l'hypothèse nulle, l'erreur éventuelle, dans le cas où cette hypothèse serait en réalité vraie, est appelée « Erreur de type 1 » ou « Erreur  $\alpha$  ».

Lorsqu'au contraire, le test nous indique qu'il ne faut pas rejeter l'hypothèse nulle, l'erreur éventuelle, au cas où cette hypothèse serait en réalité fautive, est appelée « Erreur de type 2 » ou « Erreur  $\beta$  ».

Ces indications sont interdépendantes : quand l'erreur  $\alpha$  est réduite, l'erreur  $\beta$  augmente. Cela signifie le choix du seuil  $\alpha$  pour le test à effectuer doit se faire en fonction du coût économique de l'une ou l'autre mauvaise décision.

La comparaison des couts de ces deux erreurs permet de fixer les seuils de manière optimale.

Notons que les indications  $\alpha$  et  $\beta$  permettent de formaliser un niveau de sécurité pour le résultat obtenu  $(1-\alpha)$  et un paramètre indiquant la puissance du test  $(1-\beta)$  [25].

### III.6. Etude de la linéarité

#### III.6.1. Droite de régression linéaire

##### 1. Coefficient de corrélation (r)

La corrélation permet de retrouver et de quantifier un lien de dépendance entre 2 séries ou 2 facteurs. Il faut que les séries suivent chacune une loi normale.

Le coefficient de corrélation est donné par la relation :

$$r = \frac{N \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{N \cdot \sum X^2 - (\sum x)^2} \cdot \sqrt{N \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2}} \dots\dots\dots (1)$$

N étant le nombre de couples (x, y).

Pour qu'il y ait une corrélation entre deux distributions, il faut que :  $0 < |r| < 1$  [26].

Pour confirmer l'existence d'une corrélation, il faut appliquer le test Student 't' de conformité :

$$t = \frac{|r|}{\sqrt{1-r^2}} \cdot \sqrt{N-2} \dots\dots\dots (2)$$

Ce 't' est à comparer à la table de 't'  $(1-n/2)$  avec un degré de liberté (DDL)  $n = N- 2$ .

##### 2. Régression ( $r^2$ )

La régression permet, non seulement de vérifier le lien entre deux distributions, mais aussi de le représenter graphiquement. Cette opération permet de poser une loi mathématique expliquant la relation d'une distribution par rapport à l'autre.

On représente la régression par une droite de la forme :  $y = b x + a$ .

$$b = \frac{N \sum x \cdot y - \sum x \sum y}{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \dots\dots\dots (3)$$

$$a = \frac{\sum y \sum x^2 - \sum x \sum (x \cdot y)}{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \dots\dots\dots (4)$$

**Tel que :**

y : la réponse.

x : la variable.

b : la pente de la droite.

a : l'ordonnée à l'origine.

N : nombre d'essais effectués.

r : le coefficient de corrélation [26].

### III.6.2. Comparaison de l'ordonnée à l'origine

#### 1. Test de student (t)

Ce test consiste à comparer la valeur suspecte à la moyenne des autres valeurs de l'échantillon à l'aide d'un test t. Il présente l'avantage de pouvoir être utilisé quelle que soit la taille des échantillons. Aussi, Utilisé dans le cas de comparaison d'une moyenne à une valeur connue [25].

On utilise le critère :

$$t(a) = \frac{|a|}{\sigma_a} \dots\dots\dots (5)$$

L'écart type ( $\sigma_a$ ) de l'ordonnée à l'origine (a) est donné par la relation :

$$\sigma_a = \left( \sum \frac{(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{N-1} \right)^2 \left( \frac{1}{N} + \bar{x} / \sum (x - \bar{x})^2 \right) \dots\dots\dots (6)$$



### III.6. 3. Test d'homogénéité des variances

#### 1. Test de COCHRAN

C'est un test sélectif qui permet de vérifier si une variance suspecte diffère ou non du groupe étudié. Il s'applique aux populations normales ou très voisines de la normale. C'est le test d'homogénéité des variances, test de COCHRAN (qui localise la variance la plus élevée et teste si elle est significativement plus grande que les autres [26]).

Calcul de la variance S :

$$S = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N-1}} \dots\dots\dots (7)$$

Critère à utiliser :

$$C = \frac{S^2_{max}}{\sum S^2} \dots\dots\dots (8)$$

### III.6. 4. Test d'existence d'une pente significative

#### 1. Test de FISHER

Le test de FISHER a pour but de comparer deux distributions (X et Y) suivant chacune d'elles, une loi normale est prise en tant que hypothèse sur la base de leur variance. La loi de FISHER est utilisée pour :

- Une estimation du rapport de deux variances.
- Une comparaison du rapport de deux variances à une valeur donnée.
- Une estimation d'une proportion.
- Une comparaison de deux proportions.

Elle repose sur les hypothèses suivantes :

$H_0$  :  $S(X) = S(Y)$  c'est- à dire que les variances des distributions sont égales.

$H_1$  :  $S(X) \neq S(Y)$  c'est- à dire que les variances des distributions sont différentes.

➤ Calcul de la variance totale :

$$\sum I^2 = a^2 \sum [n (y - \bar{y})^2] \dots\dots\dots (10)$$

N étant le nombre total des essais.

- Calcul de la variance due à la régression:

$$\sum T^2 = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{N} \dots\dots\dots (9)$$

n : 3 (nombre d'essais par groupe).

- Calcul de la variance résiduelle :

$$\sum R^2 = \sum T^2 - \sum I^2 \dots\dots\dots (11)$$

- ✓ **La variance due à la régression est :**

$$S_i^2 = \sum I^2 \dots\dots\dots (12)$$

- ✓ **La variance résiduelle est:**

$$S_r^2 = \frac{\sum R^2}{N-2} \dots\dots\dots (13)$$

- **Statistique du test**

$$F_1 = S_i^2 / S_r^2 \dots\dots\dots (14)$$

(Si F < 1, on inverse le numérateur et le dénominateur) [26].

### III.6.5. Test de validation de la droite de régression

L'erreur expérimentale est donnée par la relation suivante :

$$\sum E^2 = \sum [\sum (y - \bar{y})^2] \dots\dots\dots (15)$$

L'erreur de régression :

$$\sum L^2 = \sum R^2 - \sum E^2 \dots\dots\dots (16)$$

Les variances des deux erreurs expérimentales et de régression, respectivement, sont données par les relations suivantes :

$$S_E^2 = \frac{\sum E^2}{N-K} \dots\dots\dots (17)$$

$$S_L^2 = \frac{\sum L^2}{K-2} \dots\dots\dots (18)$$

➤ **Statistique du test**

$$F = \frac{S_E^2}{S_L^2} \dots\dots\dots (19)$$

**III.7. Etude de la fidélité**

➤ **Etalon 100 %**

$$b = \frac{\text{la réponse (y)}}{\text{la quantité retrouvée (x)}} \dots\dots\dots (20)$$

b : pente de régression de la forme reconstituée.

➤ **Recouvrement [27]**

Le recouvrement est calculé par :

$$R = \frac{\text{la quantité retrouvée (x)}}{\text{la quantité initial}} \cdot 100 \dots\dots\dots (21)$$

➤ **Variance de répétabilité [27]**

$$S_r^2 = \frac{SCE_r}{N-p} \dots\dots\dots (22)$$

SCE<sub>r</sub> : somme des carrés des intragroupes, elle est donnée par la relation :

$$SCE_r = \sum \left[ \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \dots\dots\dots (23)$$

➤ **Variance intergroupe [4]**

$$S_L^2 = \frac{(P-1) \cdot \left[ \frac{SCE_L}{P-1} - S_r^2 \right]}{\hat{N}} \dots\dots\dots (24)$$

$$SCE_L = SCE_t - SCE_r \dots\dots\dots (25)$$

$SCE_L$  : Somme des carrés des écarts intergroupes.

$$SCE_t = \left[ \sum \sum x^2 \right] - \left[ \frac{(\sum \sum x)^2}{N} \right] \dots\dots\dots (26)$$

$$\hat{N} = N - \frac{\sum n^2}{N} \dots\dots\dots (27)$$

Avec :

$\hat{N}$  : Nombre moyen corrigé de répétition par cellule.

$SCE_t$  : Somme totale.

➤ **Le coefficient de variance (CV) [28]**

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n} \dots\dots\dots (28)$$

$$CV (\%) = \frac{\sigma}{\bar{y}} \cdot 100 \dots\dots\dots (29)$$



Partie pratique



# Chapitre IV: Matériels et méthodes

## Introduction

Notre travail expérimental est inscrit dans le cadre de la validation analytique de la méthode du dosage du produit fini Azimycine<sup>®</sup> poudre pour suspension buvable à 200mg/5ml, fabriqué par la filiale Antibiotical du groupe Sidal et cela à travers la vérification des critères de la validation analytique tels que :

- La spécificité ;
- La linéarité ;
- La précision ;
- L'exactitude ;
- La limite de détection ;
- La limite de quantification.

Cette méthode de dosage du principe actif dans le produit fini Azimycine<sup>®</sup> poudre pour suspension buvable à 200mg/5ml a été appliqué au test de dissolution pour la validation biopharmaceutique.

## I .Matériel

### I.1.Matière

#### I.1.1. Présentation du médicament Azimycine<sup>®</sup> 200 mg / 5 ml

C'est une poudre pour suspension buvable pour enfant : flacon de 12 g poudre, contenant 600 mg d'Azithromycine sous forme dihydraté correspondant après reconstitution à 15 ml de suspension (3 mesures). Une mesure de 5 ml obtenue à l'aide du gobelet doseur correspondant à 200 mg d'Azithromycine.

**Tableaux IV.1** : Présentation du médicament Azimycine<sup>®</sup> 200 mg / 5 ml

Nom commercial	Azimycine <sup>®</sup>
Dénomination commune internationale (DCI)	Azithromycine dihydraté
Dosage	200 mg/ 5 ml
Excipients	Acide méthacrylique copolymère, Anéthol, Acétone, Phosphate de sodium, Carbonate de sodium, Oxyde de magnésium, Sodium CMC, Arome cerise, Arome de banane, Saccharose, Parahydroxybenzoate de methyl, Parahydroxybenzoate de propyl Arome de vanille, Sorbitol, Silice colloïdale anhydre et Aspartam.

## Chapitre IV : Matériel et méthodes

Présentation	Flacon de poudre avec fermeture de sécurité enfant
Forme	Suspension buvable
Laboratoire fabricant	Antibiotical / Groupe Sidal

### 1. Composition

Le médicament Azimycine<sup>®</sup> 200 mg / 5 ml est un mélange d'un principe actif Azithromycine et de plusieurs excipients cités dans le tableau suivant :

**Tableaux IV.2 :** Excipients du médicament Azimycine<sup>®</sup> 200 mg / 5 ml

Excipients	Rôle
Acide méthacrylique copolymère	Agent d'enrobage
Anéthol	Extrait aromatisant
Acétone	Solvant
Phosphate de sodium	Agent Tampon
Carbonate de sodium	Agent tampon
Oxyde de magnésium	Antiagglomérant
Sodium CMC	Agent de remplissage
Arome de cerise, Arome de banane, Arome de vanille	Amélioration ou modification des caractères organoleptiques.
Sodium methyl hydroxy benzoate	Conservateur antimicrobien
Sodium propyl hydroxy benzoate	Conservateur antimicrobien
Sorbitol	Humectant
Colloïdale anhydrous silica	Agent viscosifiant
Aspartame	Agent édulcorant
Saccharose	Agent sucrant

### 2. Classe pharmaco-thérapeutique

Antibactériens à usage systémique, de la famille des macrolides.

### 3. Posologie

Enfant : 200 mg/ kg/jours soit 5 ml, en une prise unique journalière, pendant 3 jours.

- Au dessus de 25 kg : la posologie est variable selon le poids de l'enfant (200 mg/kg/ J), en une prise unique journalière pendant 3 jours.



### 4. Mode d'emploi

La suspension buvable peut être prise pendant ou en dehors des repas. Reconstituez la suspension au moment de son emploi en ajoutant à la poudre contenue dans le flacon 10 ml d'eau minérale non gazeuse ou d'eau bouillie et refroidie mesurée à l'aide du gobelet doseur, agitez jusqu'à la mise en suspension de la totalité de la poudre, on obtient alors 15 ml environ de suspension. Ne mettez jamais un volume d'eau supérieur à 10 ml.

### 5. Indication

L'Azithromycine est limité au traitement des infections dues aux germes sensibles notamment [29] :

- Infections respiratoires Broncho-pulmonaires et ORL.
- Infection génito-urinaires.
- Infection cutanées et muqueuses.

### 6. Contre indication :

- **Absolues :**

- Antécédents de réactions allergiques à l'azithromycine ou à tout autre macrolide.
- Alcaloïdes de l'ergot de seigle (dihydroergotamine, ergotamine), cisapride.

- **Relative :**

- Agoniste dopaminergiques (bromocriptine, cabergoline, pergolide).

- **Précautions :**

Prévenir le médecin traitant en cas de :

- Insuffisance hépatique.
- Insuffisance rénale.
- Grossesse et l'allaitement.
- Prise concomitante d'autres médicaments.

### 7. Effets indésirables possibles :

- Manifestations allergiques et cutanées :

Photosensibilité, arthralgies, urticaire, prurit, réactions anaphylactiques.

- Manifestations digestives :

Diarrhée, selles molles, Nausées, douleurs abdominales, crampes abdominales, vomissements, flatulence [29].

### I.1.2. Présentation de principe actif Azithromycine

L'azithromycine, appartenant à la classe des macrolides, est rapidement devenue l'un des antibiotiques les plus prescrits par les pédiatres, notamment pour traiter les infections respiratoires. Elle est facile à administrer aux enfants sous forme de suspension orale, avec sa dose quotidienne, son traitement relativement court (trois à cinq jours) et son profil d'effets secondaires favorable.

#### 1. Le spectre d'activité

Contrairement à des macrolides tels que l'érythromycine, l'azithromycine a une activité invitro plus faible contre les bactéries Gram positif, y compris le *Streptococcus pneumoniae* [30].

#### 2. Structure chimique :

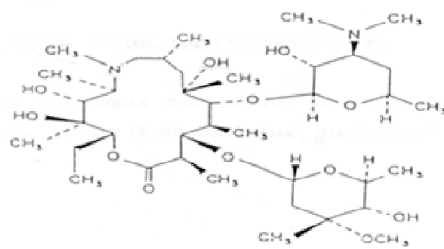


Figure IV.1 : Structure chimique de l'Azithromycine [31]

#### 3. Dénomination

- **Dénomination chimique**

Le nom de l'Azithromycine est dérivé du substituant azane et de érythromycine. Son nom chimique exact est (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-(2,6-didésoxy-3-C-3-O-diméthyle-alpha-L-ribohexopyranosyloxy)-2-éthyle-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptaméthyl-11-(3,4,6-tridésoxy-3-diméthylamino-beta-D-xylohexopyranosyloxy)-1-oxa-6-azacyclopentadécan-15-one [31].

- **Dénomination commune international** : Azithromycine dihydraté [29].

#### 4. Propriétés et identification

- **Propriétés physico-chimiques**

Les propriétés physico-chimiques du principe actif Azithromycine sont données dans le tableau IV.3.

**Tableau IV.3 :** Propriétés physico-chimiques du principe actif Azithromycine

Propriétés chimiques	Propriétés physiques
<ul style="list-style-type: none"><li>- Formule brute : <math>C_{38}H_{72}N_2O_{12}</math> [Isomère].</li><li>- Masse molaire : <math>748,9845 \pm 0,0394</math> g/mole.</li><li>C 60,94% ; H 9,69% ; N 3,74% ; O 25,63%</li><li>- Pka : 8,74 à 25°C.</li><li>- Utilisé sous forme de dihydrate.</li><li>- Aspect: poudre cristalline blanche</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- T° fusion : 113 à 115°C.</li><li>- Solubilité : peu soluble dans l'eau, 100 mg/ml à pH &lt; 5 0,2 mg/ml à pH &gt; 8</li></ul>

- **Identification**

- Spectrométrie d'absorption infrarouge (IR).
- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) [31].

#### 5. Les propriétés pharmaceutiques

- **Pharmacocinétique**

- **Absorption :**

L'Azithromycine est rapidement absorbée après une administration orale. Le pic plasmatique est atteint en 2 à 3 heures. Les études cinétiques ont mis en évidence des taux tissulaires d'Azithromycine très supérieurs aux taux plasmatiques (pouvant atteindre 50 fois la concentration plasmatique maximale), ce qui reflète la forte affinité tissulaire de la molécule.

- **Distribution :**

L'Azithromycine est largement distribuée dans l'organisme, après une prise unique de 200 mg, les concentrations observées dans les tissus cibles dépassant le CMI90 des germes le plus souvent en cause dans les infections.

- **Métabolisme :** L'Azithromycine est fortement métabolisée.

- **Élimination :**

La voie principale d'élimination est biliaire, il existe également une élimination urinaire mineur du produit. Lors d'un traitement d'une durée de 5 jours, le produit peut être retrouvé dans les urines des 24 heures jusqu'à 3 semaines après la prise.

- **Pharmacodynamique**

L'Azithromycine agit en inhibant la synthèse des protéines bactériennes en se liant à la partie 50S du ribosome et en empêchant la translocation peptidique.

### **I.1.3. Réactifs**

- $K_2HPO_4$  (Di- potassium hydrogène phosphate) ;
- L'acide phosphorique ou d'hydroxyde de sodium ;
- Acétonitrile ;
- Eau distillée.

## **I.2. Equipements**

### **I.2.1. Appareil de chromatographie HPLC**

Nous avons utilisé l'appareil HPLC de marque Waters qui se compose : d'un détecteur UV-Visible de marque Waters 2489 qui est connecté à un ordinateur pour le traitement des données, un module de marque Waters 2695 qui fait l'injection automatique, une pompe à deux pistons, une électrovanne, un dégazeur, un four dans le quel se trouve la colonne (250 mm x 4,6 mm) avec une phase stationnaire C (5  $\mu$ m) Thermo C18.

### **I.2.2. Equipement du contrôle biopharmaceutique**

Le test de dissolution a pour but de déterminer la vitesse de dissolution du principe actif c'est-à-dire l'action de disperser à l'état moléculaire, le principe actif dans le milieu de dissolution. Nous avons utilisé un dissolutest de type Sotax, muni d'un système d'agitation à palette et contenant sept (07) back de dissolution.

### **I.2.3. Autres équipements**

Pour réaliser notre travail, nous avons aussi utilisé un appareillage de laboratoire indiqué au tableau IV.4.

Tableaux IV.4 : Appareillages de laboratoire

Appareillage	Marque	Rôle
pH mètre	HANA pH 20 pH meter	Mesure du pH
Dispositif de filtration sous vide	/	Filtration
Bain à ultrasons	(f) Fisher Scientific FB 15052	Dégazage de la phase mobile
Centrifugeuse	Centrifugeuse 4225	Sédimentation des particules non solubilisées
Agitateur magnétique.	IKA-Combimag RCL	Homogénéisation d'un milieu
Balance électronique	/	Pesées de matières premières et réactives

## II. Méthodes

### II.1. Validation analytique de la méthode de dosage de standard et de produit fini (Azimycine®)

#### II.1.1. Conditions opératoires

- Température : 60°C.
- Longueur d'onde : 215nm.
- Débit : 1,5 ml/min.
- Quantité injectée : 20µl.
- Colonne : C<sub>18</sub> (250 x 4,6 nm) C (5µm).

#### II.1.2. Principe de dosage

C'est une méthode physico-chimique, reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, elle prend une importance de plus en plus considérable, à cause de la grande précision, reproductibilité, rapidité d'exécution, la possibilité de réaliser conjointement séparation, identification et dosage. L'objectif est l'identification (calcul de la pureté) des composants d'un médicament toute en comparant entre le standard et le produit fini.

### II.1.3. Préparation des solutions pour les critères de validation

- **Préparation de la solution tampon**

On dissout 3,5g de  $K_2HPO_4$  (Di-potassium hydrogène phosphate) dans une fiole de 500 ml d'eau distillée, on ajuste le pH à 9 avec une solution d'acide phosphorique.

- **Préparation de la phase mobile**

La phase mobile est composée d'un mélange de la solution tampon et du solvant Acétonitrile (V/V : 35/65). Le mélange obtenu est mis sous agitation magnétique, filtré sur un filtre de  $0,45\mu m$  puis dégazé dans un bain à ultrasons.

- **Préparation de placebo**

On pèse 448,83 mg d'échantillon (placebo) dans une fiole de 25 ml. On le dissout, on complète jusqu'au trait de jauge avec la phase mobile et on agite pendant 30 minutes puis on centrifuge la solution.

*Définition du placebo* : le placebo est un médicament qui contient tous les excipients de la formule initiale (quantitative et qualitative) à l'exception du principe actif. On peut aussi appeler un placebo un médicament sans principe actif et ou sans un des excipients de la formule dans le but de valider une méthode analytique de dosage.

#### 1. Préparation des solutions pour le critère de spécificité et le critère de précision:

*Le critère de spécificité* est le premier critère de validation analytique qui s'effectue comme suite: on injecte 7 injections de chacune de ces deux solutions (solution standard et solution de produit fini à 100 %) dans une seule journée dans la vanne d'injection de l'appareil HPLC.

*Le critère de précision* exprime le degré de dispersion existant entre une série de mesures de multiples prises d'un même échantillon homogène, il s'effectue comme suite : on injecte des quantités prises des deux solutions (solution standard et solution de produit fini à 100 %) 7 fois répété pendant 3 jours dans la vanne d'injection de l'appareil HPLC.

##### a) Préparation de la solution standard :

On pèse 25 mg du principe actif Azithromycine di hydraté (standard de référence) dans une fiole jaugée de 25 ml. On agite pour bien dissoudre, on complète jusqu'au trait jauge avec la phase mobile et on fait passer la solution dans un bain à ultrasons pour le dégazer.

**b) Préparation des échantillons du produit fini :**

On pèse 448,83 mg d'échantillon (quantité de médicament contenant 25mg de PA) dans une fiole de 25 ml soit 1mg /ml de principe actif. On le dissous, on complète jusqu'au trait de jauge avec la phase mobile et on agite pendant 30 minutes puis on centrifuge la solution.

**2. Préparation des solutions pour le critère de linéarité et le critère d'exactitude:**

*La linéarité* est une capacité à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (s) en substance (s) à étudier dans l'échantillon à analyser qui s'effectue comme suite : on prépare cinq (05) dilutions de 80 à 120 % pour chacune des deux solutions (solution standard et solution de produit fini), puis on injecte trois (03) injections de chacune de ces dilutions.

*Le critère d'exactitude* exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, il s'effectue de la même manière que le critère de linéarité.

**a) Préparation de la solution standard**

- Préparation de la solution mère [20 mg/ml]:

On pèse 400 mg du principe actif Azithromycine di hydraté dans une fiole jaugée de 20 ml. On agite pour bien dissoudre, on complète jusqu'à trait jauge avec la phase mobile et on fait passer la solution dans un bain à ultrasons pour le dégazer.

- Préparation des solutions filles :

On prépare cinq (05) dilutions de 80 % jusqu'à 120 % à partir de la solution mère. Ces dilutions sont données dans le tableau suivant :

**Tableaux IV.5:** Préparation des solutions filles

Solution fille	80 %	90 %	100 %	110 %	120 %
Concentration de la solution fille (mg/ml)	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
Volume de la solution mère (ml)	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
Volume de la phase mobile (ml)	19,2	19,1	19	18,9	18,8

**Exemple :** pour préparer la dilution de 80%, on prélève 0,8 ml de la solution mère et on complète jusqu'au 20 ml par la phase mobile.

**b) Préparation de la solution du produit fini**

- Préparation des échantillons :

On prépare cinq (05) échantillons de produit fini ayant une concentration en principe actif allant de 80 % à 120 % (cf. tableau IV.6).

**Tableaux IV.6 :** Préparation des échantillons du produit fini

Echantillon	80 %	90 %	100 %	110 %	120 %
Concentration de l'échantillon (mg/ml)	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
Poids du produit fini pesé (mg)	359,07	403,95	448,83	493,72	538,60
Volume de la phase mobile (ml)	20	20	20	20	20

**Exemple :** Pour préparer la dilution de 120 %, on pèse 538,60 mg d'échantillon de produit fini dans une fiole de 25 ml. On le dissous, on complète jusqu'à trait de jauge avec la phase mobile et on agite pendant 30 minutes puis on centrifuge la solution.

**3. Préparation de la solution standard pour le critère des limites de détection et de quantification**

*Le critère de la limite de détection* correspond à la plus petite quantité d'une substance à analyser détectée dans un échantillon.

*Le critère de la limite de quantification* correspond à la plus petite quantité de composé pouvant être dosé par la méthode.

Ces deux critères s'effectuent comme suite :

On prépare sept (07) dilutions de la solution standard ayant une concentration qui varie de 1 à  $10^{-6}$  mg/ml à partir de la solution standard 100% c'est-à-dire [1mg /ml] puis on effectue une injection pour chaque dilution.

**Exemple :** pour préparer la dilution de concentration [0,1 mg/ ml], on prélève 2 ml de la solution standard de 100% de concentration [1 mg/ ml] et on complète jusqu'au 20 ml par la phase mobile pour avoir une concentration de [0,1 mg/ ml].



### II.1.4. Formule de calcul pour le dosage de l’Azithromycine (%)

La formule de calcul utilisée pour le dosage du principe actif étudié (Azithromycine) est donnée ci-dessous :

$$\text{Titre (mg/ 5ml)} = \frac{\text{Aire (ech)}}{\text{Aire (STD)}} * [\text{STD}] * \frac{\text{pesée (STD)}}{\text{pesée (ech)}} * \frac{\text{Titre (\%)}}{100} * \frac{PM}{V_F} * V_p$$

Avec : Aire (ech) : Aire d’échantillon de produit fini Azimycine®.

Aire (STD) : Aire de standard.

[STD] : Concentration de standard.

Pesée (STD) : La pesée de standard en (mg).

Pesée (ech) : La pesée d’échantillon en (mg).

PM : Poids moyen du contenu de poudre : 10,8 à 13,2 g/flacon (12000 mg/).

Titre (%): Titre massique du standard en (%) (97,3 %).

V<sub>F</sub>: Volume théorique par flacon (15 ml).

V<sub>p</sub> : Volume théorique par prise unitaire (pour 200 mg d’Azithromycine) = 5 ml.

## II.2. Validation biopharmaceutique de la méthode de dissolution de produit fini Azimycine®

### II.2.1. Conditions opératoires

#### L’appareil de dissolution

- Milieu : 900 ml de tampon.
- Vitesse d’agitation : 75 tr/ min.
- Système d’agitation : palette.
- Temps de dissolution : 45 minutes.
- PH : 6,5.
- Température de dissolution : 37 ± 5 °C.

#### L’appareil HPLC

- Température de four : 60°C.
- Longueur d’onde : 215nm.
- Débit : 1,5 ml/min.
- Quantité injectée : 20µl.
- Colonne : C<sub>18</sub> (250 x 4,6 nm) C (5µm).

### II.2.2. Principe de la méthode de dissolution

Le test de dissolution in vitro est réalisé selon le protocole opératoire décrit par la monographie générale du test de dissolution de l'USP appliqué à l'Azimycine<sup>®</sup> 200 mg/ 05 ml suivant les conditions opératoires données au paragraphe II.2.1.

### II.2.3. Préparation des solutions

#### a) Préparation de la solution tampon

Dissoudre 42 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Di-potassium hydrogène phosphate) dans un récipient de six (06) litres d'eau distillée, ajustez le pH à 6,5 avec une solution d'acide phosphorique.

#### b) Préparation de la phase mobile

La phase mobile est composée du mélange phosphate/Acétonitrile (V/V/ : 35/65), agitez, filtrez sur un filtre de 0,45µm puis dégazez le mélange dans un bain à ultrasons.

#### c) préparation de la solution standard

On pèse 25 mg du principe actif Azithromycine di hydraté (standard de référence) dans une fiole jaugée de 25 ml. On agite pour bien dissoudre, on complète jusqu'à trait jauge avec la phase mobile et on fait passer la solution dans un bain à ultrasons pour le dégazer.

#### d) préparation de la solution d'échantillon de produit fini

On met une quantité de poudre de 4 g d'Azimycine<sup>®</sup> dans chaque back contenant 900 ml de solution tampon et pendant un temps d'agitation totale de 45 min. On fait des prélèvements à 5, 15, 30 et 45 mn de 5ml après on ajoute 5 ml de la solution tampon dans chaque back puis on filtre et on injecte dans l'HPLC.

### II.2.4. Formule de calcul pour le taux de dissolution (%)

$$\% \text{ dissolution} = \frac{\text{Aire (ech)}}{\text{Aire (STD)}} * \frac{V_{\text{diss}}}{\text{pesée (ech)}} * \frac{V_F}{V_P} * [\text{STD}] * \text{Titre(\%)}$$

Avec: Aire (ech) : Aire d'échantillon de produit fini Azimycine<sup>®</sup>.

Aire (STD) : Aire de standard.

V<sub>diss</sub> : Volume de dissolu- test (900 ml).

Pesée (ech): La pesée d'échantillon en (mg).

V<sub>th</sub> : Volume théorique par flacon (15 ml).

V : Volume théorique par prise unitaire 5ml (pour 200 mg d'Azithromycine).

[STD] : Concentration de standard.

Titre (%): Titre massique du standard en (%) (97,3 %).

### II.2.5. Contrôle analytique et biopharmaceutique du produit fini Azimycine®

La méthode de dosage du principe actif dans le produit fini a été appliquée pour le contrôle analytique et biopharmaceutique du produit Azimycine®, suspension buvable à 200mg/5ml.

Le dosage du principe actif dans le produit fini et dans les échantillons du test de dissolution du produit Azimycine®, suspension buvable à 200mg/5ml ont été réalisés dans les mêmes conditions opératoires chromatographiques. La même procédure de préparation des solutions (standard et produit fini à 100 %) à été appliquée pour les deux (02) cas.



# Chapitre V: Résultats et discussion

Dans cette partie expérimentale, nous allons représenter sous forme tabulaire et sous forme graphique les résultats analytiques obtenus pour la validation analytique de la méthode de dosage du principe actif Azitromycine dans une suspension buvable à 200 mg/ 5ml.

L'interprétation des résultats analytiques a été réalisée à l'aide des tests statistiques en utilisant un logiciel de calcul intégré dans l'appareil HPLC.

De même, les résultats obtenus pour le profil de dissolution du produit fini Azimycine<sup>®</sup> poudre pour suspension buvable à 200mg/5ml ont été interprétés afin de vérifier le contrôle biopharmaceutique pour le produit étudié.

### I. Validation analytique de la méthode de dosage de standard et de produit fini Azimycine<sup>®</sup>

#### I.1. Spécificité

##### a- Spécificité par rapport à la phase mobile

Après l'injection de la phase mobile, les résultats ne montrent aucun pic ayant le même temps de rétention que les substances à analyser (Principe actif). La méthode est spécifique par rapport à la phase mobile.

##### b- Spécificité du standard

Un système chromatographique (le standard) est dit spécifique si parmi les nombreux constituants à identifier, la méthode ne fournit qu'un signal pour le seul constituant à mesurer (Principe actif) bien séparé des autres constituants par un temps de rétention connu. La spécificité est vérifiée par le calcul de % CV des 7 injections de la solution du standard à 215 nm. Le standard de référence utilisé pour la validation du dosage par HPLC WORKING STANDARD AZITHROMYCINE USP N° de lot AZT/P1101003 de puissance : 97,30%.

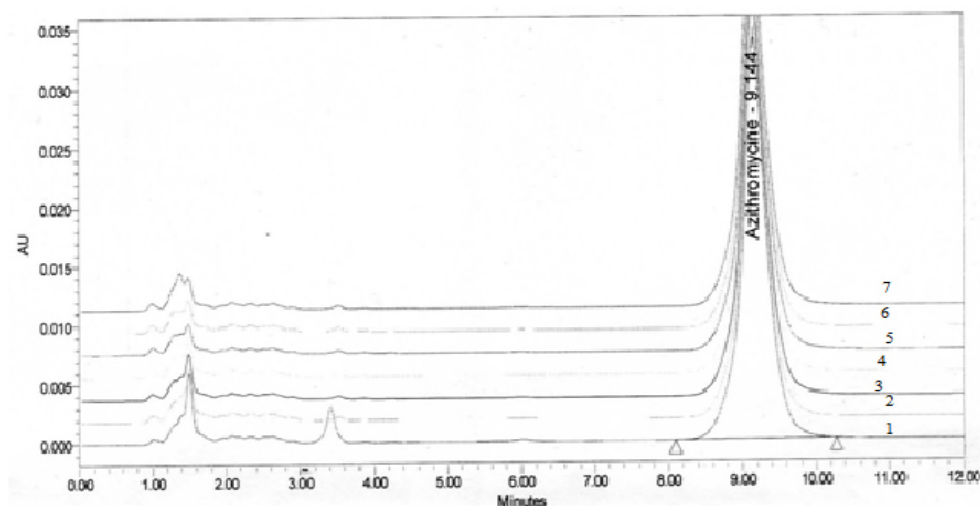
Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau V.1 : Spécificité du standard**

Essais	Aires des pics d'Azithromycine
1	834815
2	835514
3	836149

4	835650
5	831310
6	832159
7	832063
<b>Moyenne des aires</b>	<b>5837660</b>
<b>CV (%) &lt; 2%</b>	<b>0,225</b>
<b>Nombre de plateaux théorique &gt;500</b>	<b>3928,28</b>
<b>Facteur de système (0,8&lt;F<sub>s</sub>&lt;1,6).</b>	<b>0,93</b>
<b>Temps de rétention (min).</b>	<b>9,1359</b>

La méthode de dosage utiliser dans cette étude est spécifique par rapport à la phase mobile et l'analyse des résultats montre également que le système chromatographique est spécifique. (Voir l'annexe 2).

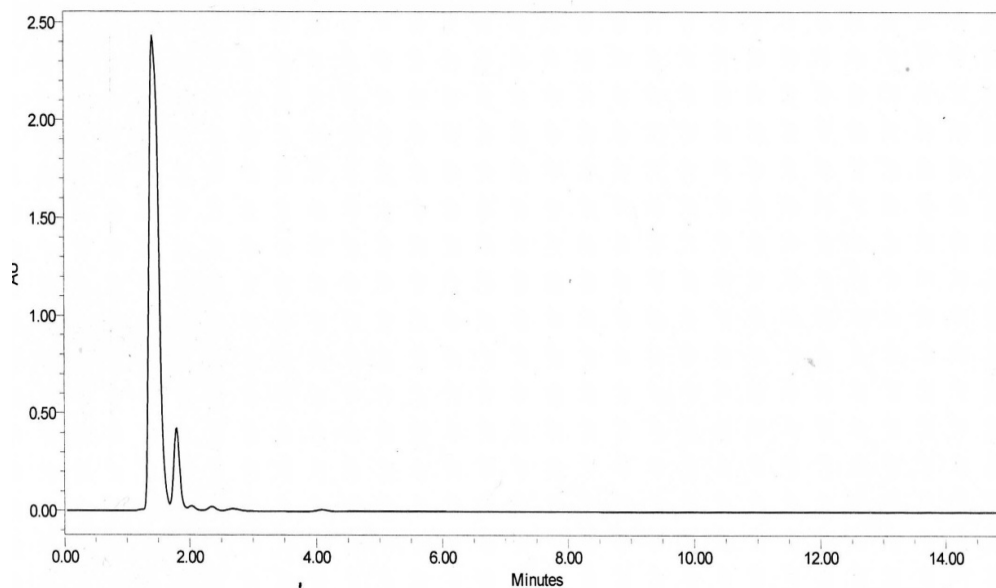


**Figure V.1:** Chromatogramme du critère de spécificité pour le standard à 100 %

### c- Spécificité par rapport au placebo

Après l'injection de placebo, les résultats ne montrent aucun pic ayant le même temps de rétention que les substances à analyser (Azithromycine).

La méthode est spécifique par rapport au placebo. (Voir l'annexe 2).



**Figure V.2 :** Chromatogramme du critère de spécificité pour le placé

#### d- Spécificité de produit fini

Le produit fini Azimycine<sup>®</sup> est dit spécifique si parmi les nombreux constituants à identifier, la méthode ne fournit qu'un signal pour le seul constituant à mesurer (Principe actif) bien séparé des autres constituants par un temps de rétention connu. La spécificité est vérifiée par le calcul du % CV des 7 injections de la solution de produit fini à 215nm.

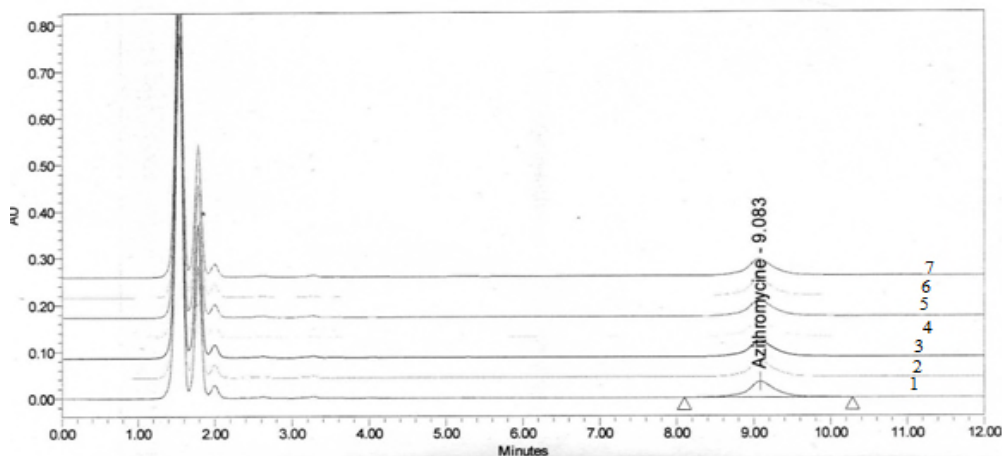
Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau V.2 :** Spécificité du produit fini

Essais	Aires des pics d'Azithromycine
1	853689
2	858754
3	858577
4	859766
5	856390
6	859836
7	853578

<b>Moyennes des aires</b>	857227
<b>CV (%) &lt; 2%</b>	0,29
<b>Nombre de plateaux théorique &gt;500</b>	3928,28
<b>Facteur de système (0,8&lt;F<sub>S</sub>&lt;1,6)</b>	0,93
<b>Temps de rétention (min)</b>	9,073

La méthode de dosage utiliser dans cette étude est spécifique par rapport à la phase mobile, et l'analyse des résultats montre également que le produit fini est spécifique (**Voir l'annexe 2**).



**Figure V.3** : Chromatogramme du critère de spécificité pour le produit fini à 100 %

### I.2. Linéarité du standard et du produit fini Azimycine®

La linéarité est déterminée en injectant cinq (05) solutions de standard de référence à des concentrations initiales allant de 80% à 120% à partir d'une solution mère de 1,00 mg/ml.

On obtient une droite de régression de forme :  $Y = b X + a$ .

**X** : mg/ml ; **Y** : Aires ; **a** : ordonnée à l'origine ; **b** : la pente.

Les résultats obtenus pour le standard et l'échantillon du produit fini sont regroupés respectivement dans le tableau V.3 et le tableau V.4.



Tableau V.3 : Linéarité du standard

Essai	Concentration (%)	Concentration (mg/ml)	Aires des pics (µV/seconde)
1	80%	0,8	657862
2		0,8	658764
3		0,8	670071
1	90%	0,9	760916
2		0,9	751703
3		0,9	750921
1	100%	1,0	826064
2		1,0	825931
3		1,0	840289
1	110%	1,1	903150
2		1,1	898690
3		1,1	897415
1	120%	1,2	991940
2		1,2	990940
3		1,2	990559

(Voir annexe 3)

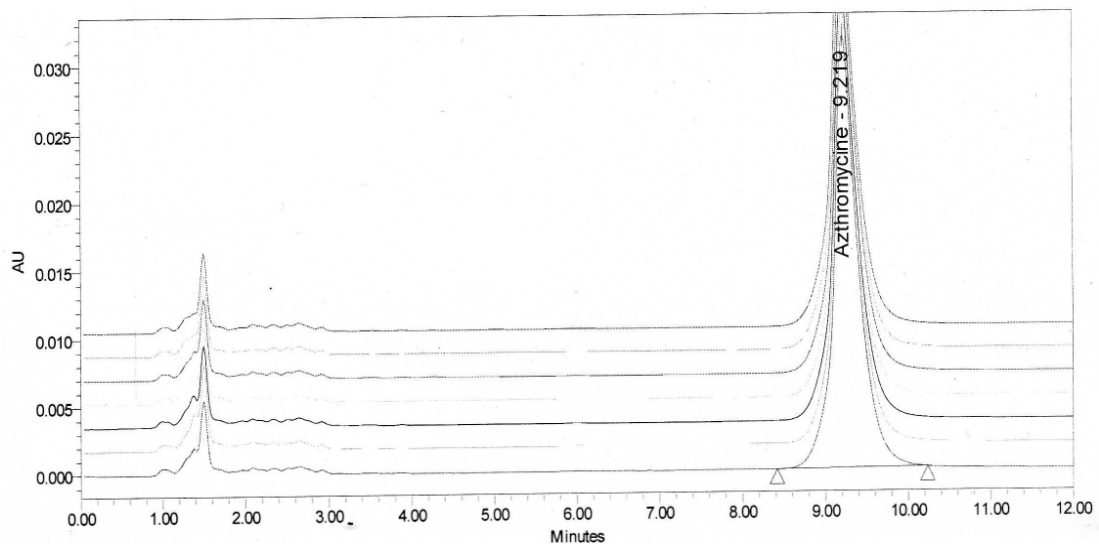
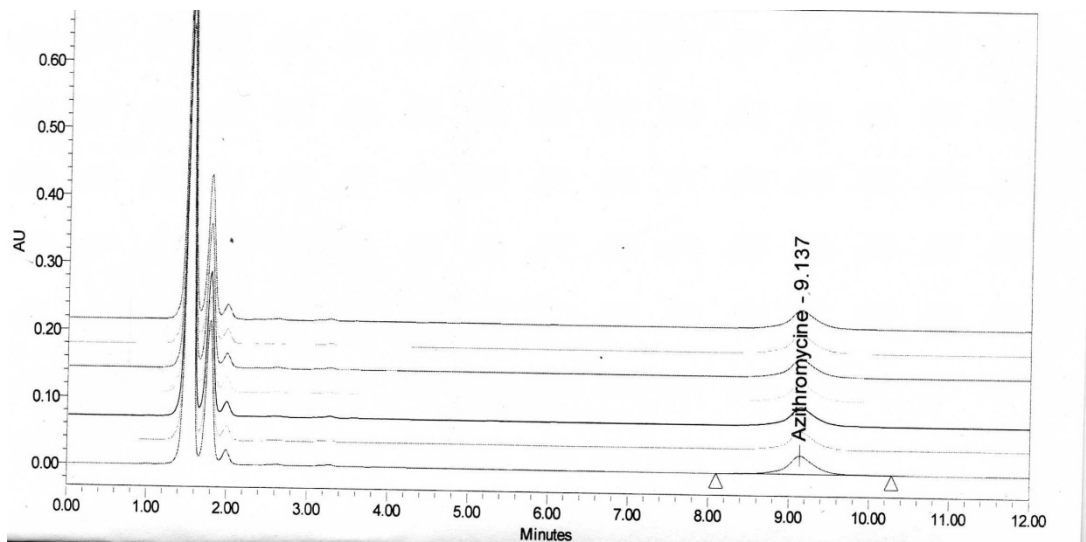


Figure V.4 : Chromatogramme du critère de linéarité du Standard à 80%

Tableau V.4 : Linéarité du produit fini Azimycine®

<b>Essai</b>	<b>Concentration (%)</b>	<b>Concentration (mg/ml)</b>	<b>Aires d'échantillon (μV/seconde)</b>
1	80%	0,8	716724
2		0,8	688413
3		0,8	678196
1	90%	0,9	769097
2		0,9	770439
3		0,9	768749
1	100%	1,0	853689
2		1,0	853578
3		1,0	856390
1	110%	1,1	956745
2		1,1	961624
3		1,1	987109
1	120%	1,2	1078582
2		1,2	1072922
3		1,2	1075073

(Voir annexe 4)



**Figure V.5 :** Chromatogramme du critère de linéarité du produit fini à 80%

**I.2.1. Vérification statistique de la linéarité du standard et du produit fini Azimycine®**

a) Droite de régression linéaire

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures (V.6 et V.7) et portés dans les tableaux (V.5 et V.6):

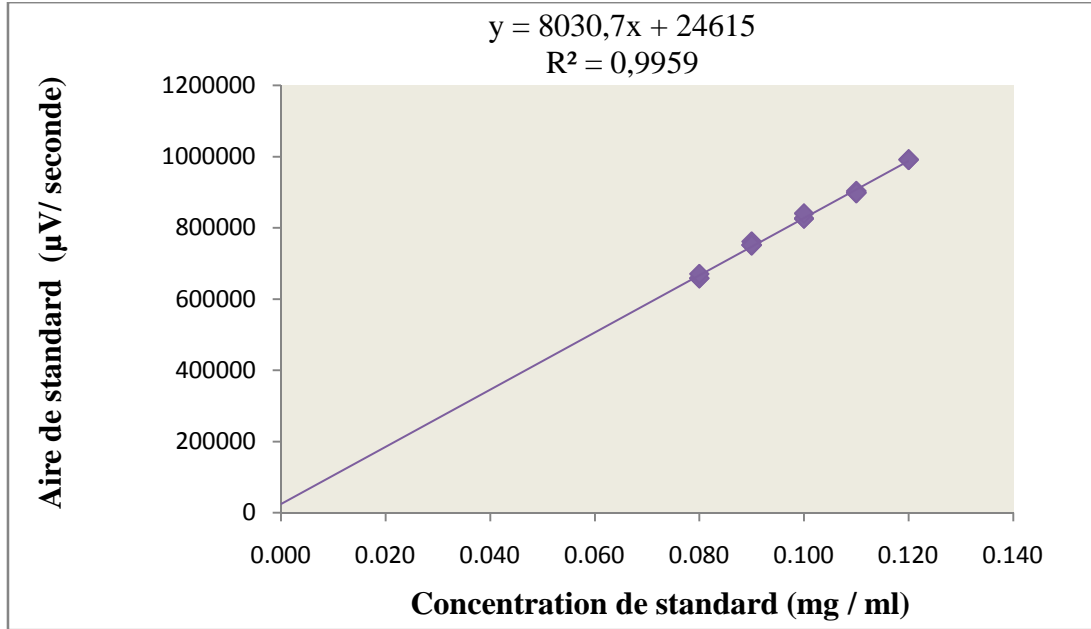


Figure V.6 : Courbe de la linéarité du standard

Tableau V.5 : Droite de régression pour le standard

$y = b x + a$ $\longrightarrow$ $y = 8030,7 x + 24615$	
<b>Pente (b)</b>	8030,66333
<b>Ordonnée à l'origine (a)</b>	24614,66667
<b>Coefficient de corrélation (R)</b>	0,99797
<b>Coefficient de régression (R<sup>2</sup>)</b>	0,99594

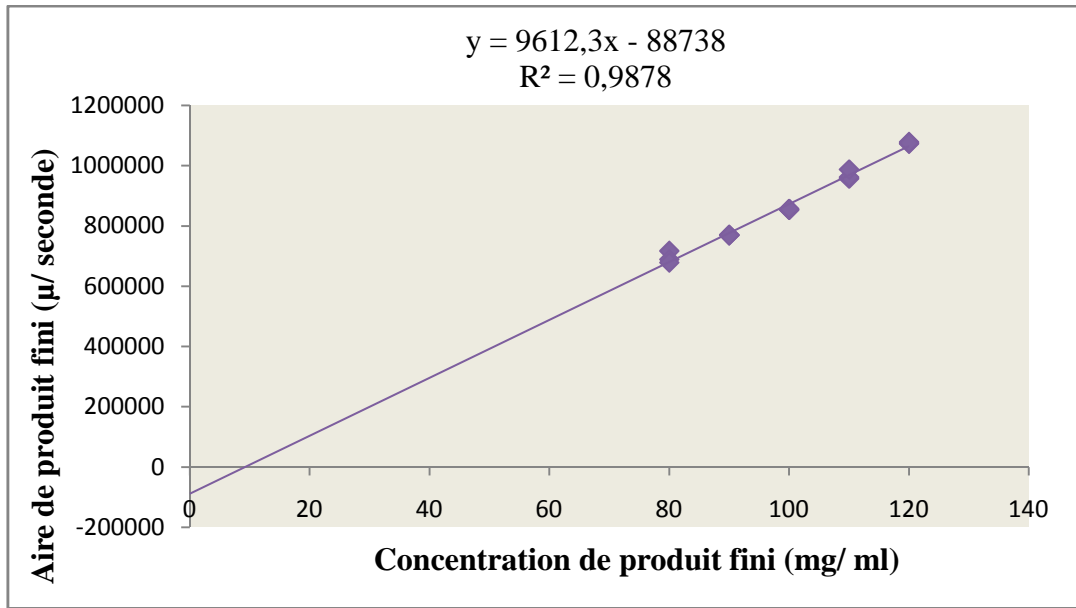


Figure V.7: Courbe de la linéarité du produit fini

Tableau V.6 : Droite de régression pour l'échantillon du produit fini Azimycine®

$y = b x + a \quad \longrightarrow \quad y = 9612,27000 x - 88738,33333$	
<b>Pente (b)</b>	9612,27000
<b>Ordonnée à l'origine (a)</b>	- 88738,33333
<b>Coefficient de corrélation (R)</b>	0,99390
<b>Coefficient de régression (R<sup>2</sup>)</b>	0,98783

Le coefficient de corrélation (R) pour la droite de régression du standard et celui de l'échantillon est compris entre :  $0 < |R| < 1$  ce qui explique qu'il y a une dépendance entre les deux variables x et y.

La valeur de coefficient de régression (R<sup>2</sup>) montre qu'il y a un lien entre les deux distributions x et y, qu'on peut représenter par une droite de la forme  $y = b x + a$ .

La valeur du coefficient de corrélation est au voisinage de 1, donc la représentation des aires en fonction des concentrations est considérée **linéaire**.

**b) Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro**

Les résultats obtenus sont représentés dans les deux tableaux suivants :

**Tableau V.7 :** Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro pour le standard

<b>Ordonnée à l'origine (a)</b>	24614,66667
<b>Ecart type de l'ordonnée à l'origine</b>	14365,90494
<b>N</b>	15
<b>t<sub>calculé</sub></b>	1,71

$$t_{\text{calculé}} = 1,71 < t_{\text{théorique } 5\%} = 2,16$$

Le coefficient de student calculé pour le premier cas est dans les normes donc le test est valide au risque de l'erreur de 5%.

**Tableau V.8 :** Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro pour le produit fini Azimycine<sup>®</sup>

<b>Ordonnée à l'origine (a)</b>	-88738,33333
<b>Ecart type de l'ordonnée à l'origine</b>	29887,73623
<b>N</b>	15
<b>t<sub>calculé</sub></b>	2,97

$$t_{\text{calculé}} = 2,97 < t_{\text{théorique } 1\%} = 3,01$$

Le coefficient de Student calculé pour le deuxième cas est dans les normes donc le test est valide au risque de l'erreur de 1%.

c) Test d'homogénéité des variances

Les résultats obtenus sont représentés dans les deux tableaux suivants :

**Tableaux V.9 :** Test d'homogénéité des variances pour le standard

$S_{2max}$	68086746,33337
<b>Somme des variances</b>	154848783,66663
$C_{calculé}$	0,43970
<b>k (nbr essai)</b>	5
<b>n (nbr répétition par essai)</b>	3

**Tableaux V.10:** Test d'homogénéité des variances pour le produit fini

$S_{2max}$	398384432,33337
<b>Somme des variances</b>	675756278,66663
$C_{calculé}$	0,58954
<b>k (nbr essai)</b>	5
<b>n (nombre de répétitions par essai)</b>	3

A partir de ces résultats on constate que le test de COCHRAN est bien significatif.

- Pour le standard :  $C_{calculé} = 0,43970 \leq C_{théorique} 5\% = 0,68$ .
- Pour le produit fini :  $C_{calculé} = 0,58954 \leq C_{théorique} 5\% = 0,68$ .

L'analyse d'homogénéité des variances peut être considéré **comme homogène au risque 5%**.

**d) Test d'existence d'une pente significative :**

Les résultats obtenus sont représenté dans les tableaux suivants :

**Tableaux V.11 :** Test d'existence d'une pente significative pour le standard

	DDL	Somme des carrés	Variance	F1 calculé
Variation totale	14	194263757756	-	3187,40
Variation due à la régression	1	193474660720,033	193474660720,033	
Variation résiduelle	13	789097035,96671	60699771,99744	

**Tableaux V.12 :** Test d'existence d'une pente significative pour le produit fini

	DDL	Somme des carrés	Variance	F1 calculé
Variation totale	14	280602673689,33300	-	1055,03
Variation due à la régression	1	277187203658,70000	277187203658,70000	
Variation résiduelle	13	3415470030,63330	262728463,89487	

Pour vérifier si la pente est significative, nous avons exploité ces résultats afin de calculer  $F_1$  (coefficient de Fisher) qu'on va comparer à celui des tables statistiques au risque 1% et 5%.

Nous avons obtenu :

- Pour le standard :  $F_1 \text{ calculé} = 3187,40 > F \text{ théorique } 1\% = 9,07.$
- Pour produit fini :  $F_1 \text{ calculé} = 1055,03 > F \text{ théorique } 1\% = 9,07.$

On conclue qu'il existe une pente significative dans les deux cas, pour le standard ainsi que pour l'échantillon (produit fini Azimycine<sup>®</sup>) au risque 1%.

**e) Test de validité de la droite de régression :**

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux suivants :

**Tableaux V.13 :** Test de validité de la droite de régression pour le standard

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	F <sub>2</sub> calculé
Erreur expérimentale	10	309697567,33333	30969756,733333	5,16
Erreur de la régression	3	479399468,63337	159799822,87779	

**Tableaux V.14 :** Test de validité de la droite de régression pour l'échantillon de produit fini Azimycine<sup>®</sup>

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	F <sub>2</sub> calculé
Erreur expérimentale	10	1351512557,33333	135151255,733333	5,09
Erreur de la régression	3	2063957473,29997	687985824,43332	

A partir des résultats des deux tableaux précédents, on constate bien que :

- Pour le standard :  $F_2 \text{ calculé} = 5,16 < F \text{ théorique } 1\% = 6,55$ .
- Pour le produit fini :  $F_2 \text{ calculé} = 5,09 < F \text{ théorique } 1\% = 6,55$ .

L'ajustement dans les deux cas est considéré comme valide au risque 1%.



**Tableau V.15:** Tableau récapitulatif de la linéarité du principe actif (standard) Azithromycine

<b>Pente (b)</b>		8030,66333		
<b>Ordonnée de l'origine (a)</b>		24640,66667		
<b>Coefficient de régression (R<sup>2</sup>)</b>		0,99594		
<b>Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro</b>				
<b>t<sub>calculé</sub></b>	<b>t<sub>théorique 5%</sub></b>	<b>t<sub>théorique 1%</sub></b>	<b>Condition</b>	<b>Conclusion</b>
1,71	2,16	3,01	$t < t_{th}$	Valide au risque 5%
<b>Homogénéité des variances</b>				
<b>C<sub>calculé</sub></b>	<b>C<sub>théorique 5%</sub></b>	<b>C<sub>théorique 1%</sub></b>	<b>Condition</b>	<b>Conclusion</b>
0,44	0,68	0,79	$C < C_{th}$	Valide au risque 5%
<b>Existence d'une pente</b>				
<b>F<sub>1</sub> calculé</b>	<b>F<sub>théorique 5%</sub></b>	<b>F<sub>théorique 1%</sub></b>	<b>Condition</b>	<b>Conclusion</b>
3187,40	4,67	9,07	$F_1 > F_{th}$	Valide au risque 1%
<b>Validité de la droite de régression</b>				
<b>F<sub>2</sub> calculé</b>	<b>F<sub>théorique 5%</sub></b>	<b>F<sub>théorique 1%</sub></b>	<b>Condition</b>	<b>Conclusion</b>
5,16	3,71	6,55	$F_2 < F_{th}$	Valide au risque 1%

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus confirment la linéarité de la méthode d'analyse du principe actif **Azithromycine**.

**Tableau V.16 :** Tableau récapitulatif de la linéarité de produit fini Azimycine®

<b>Pente (b)</b>		9612,27000		
<b>Ordonnée de l'origine (a)</b>		-88738,33333		
<b>Coefficient de régression (R<sup>2</sup>)</b>		0,98783		
<b>Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro</b>				
<b>t<sub>calculé</sub></b>	<b>t<sub>théorique 5%</sub></b>	<b>t<sub>théorique 1%</sub></b>	<b>Condition</b>	<b>Conclusion</b>
2,97	2,16	3,01	t < t <sub>th</sub>	Valide au risque 1%
<b>Homogénéité des variances</b>				
<b>C<sub>calculé</sub></b>	<b>C<sub>théorique 5%</sub></b>	<b>C<sub>théorique 1%</sub></b>	<b>Condition</b>	<b>Conclusion</b>
0,59	0,68	0,79	C < C <sub>th</sub>	Valide au risque 5%
<b>Existence d'une pente</b>				
<b>F<sub>1</sub> calculé</b>	<b>F<sub>théorique 5%</sub></b>	<b>F<sub>théorique 1%</sub></b>	<b>Condition</b>	<b>Conclusion</b>
1055,03	4,67	9,07	F <sub>1</sub> > F <sub>th</sub>	Valide au risque 1%
<b>Validité de la droite de régression</b>				
<b>F<sub>2</sub> calculé</b>	<b>F<sub>théorique 5%</sub></b>	<b>F<sub>théorique 1%</sub></b>	<b>Condition</b>	<b>Conclusion</b>
5,09	3,71	6,55	F <sub>2</sub> < F <sub>th</sub>	Valide au risque 1%

Les résultats obtenus confirment la **linéarité** de la méthode d'analyse de l'Azithromycine appliquée au produit fini.

### **I.2.2. Interprétation des résultats statistiques**

Sur la base des résultats obtenus et des calculs statistiques réalisés sur les droites de régression du produit fini Azimycine®, suspension buvable à 200mg/5ml, nous pouvons dire que la variation des courbes (aire en fonction de la concentration) est linéaire avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,98, confirmée par les tests statistiques (test de student, test de Cochran et test de Fisher) qui sont conformes aux conditions exigées donc la méthode d'analyse présente un profil linéaire validé.

**I.3. Précision du standard et du produit fini**

La précision ou fidélité d'une méthode représente la concordance dans une zone définie entre les résultats de plusieurs mesures répétées, effectuées sur un même échantillon dans des conditions constantes et déterminées le même jour (répétabilité) et pendant 3 jours successifs (reproductibilité).

Les résultats qu'on a obtenus pour le standard et le produit fini sont regroupés respectivement dans les deux tableaux suivants :

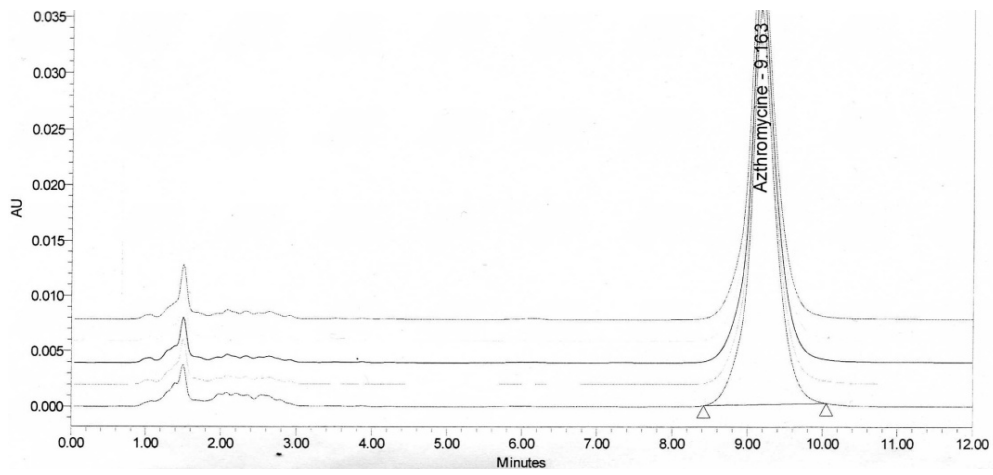
**Tableau V.17: Précision du standard**

<b>Essai (J/E)</b>	<b>Quantité introduite(%)</b>	<b>Aire des pics</b>	<b>Quantité retrouvée (%)</b>	<b>Recouvrement (%)</b>
<b>J1/1</b>	<b>100%</b>	834815	100,88	100,88
<b>J1/2</b>		835514	100,97	100,97
<b>J1/3</b>		836149	101,05	101,05
<b>J1/4</b>		835650	100,99	100,99
<b>J1/5</b>		831310	100,45	100,45
<b>J1/6</b>		832159	100,55	100,55
<b>J1/7</b>		832063	100,54	100,54
<b>J2/1</b>	<b>100%</b>	829119	100,17	100,17
<b>J2/2</b>		830697	100,37	100,37
<b>J2/3</b>		829247	100,19	100,19
<b>J2/4</b>		829588	100,23	100,23
<b>J2/5</b>		829709	100,25	100,25
<b>J2/6</b>		830417	100,34	100,34
<b>J2/7</b>		828896	100,15	100,15
<b>J3/1</b>	<b>100%</b>	828651	100,12	100,12
<b>J3/2</b>		828001	100,03	100,03
<b>J3/3</b>		829013	100,16	100,16
<b>J3/4</b>		827825	100,01	100,01
<b>J3/5</b>		830045	100,29	100,29
<b>J3/6</b>		832317	100,57	100,57
<b>J3/7</b>		832747	100,63	100,63

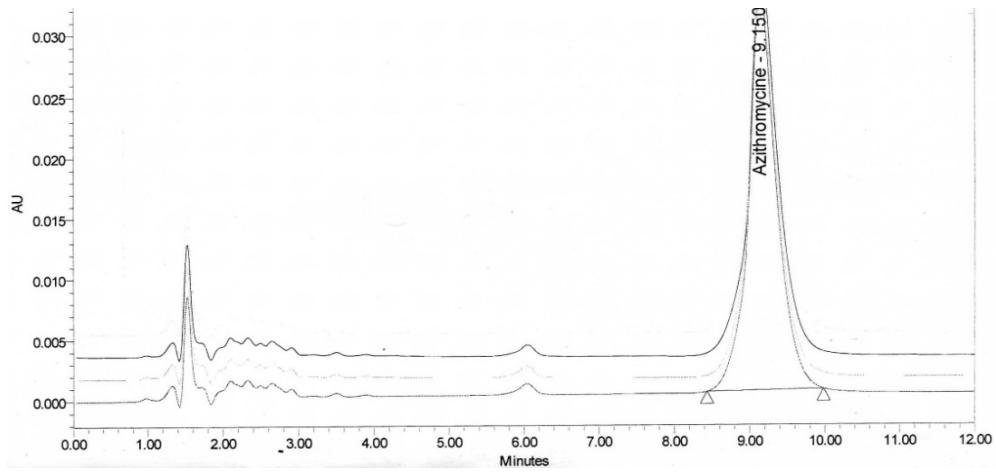
(Voire annexe 5)

J : Jour et E : Essai

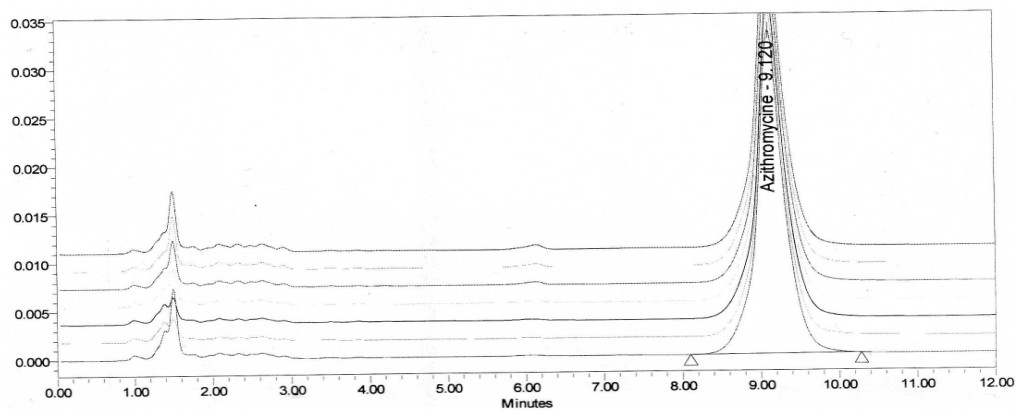
1<sup>ère</sup> jour :



2<sup>ème</sup> jour :



3<sup>ème</sup> jour :



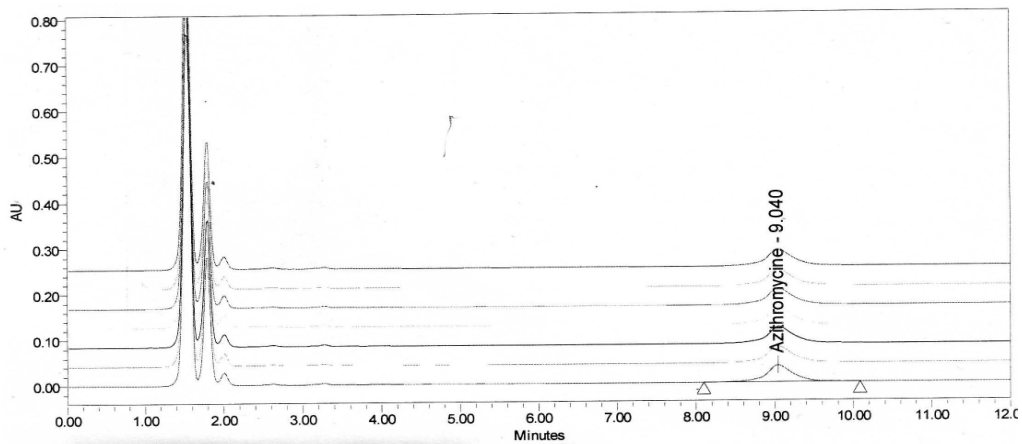
**Figure V.8:** Chromatogrammes du critère de précision par rapport au standard à dilution 100%

**Tableau V.18 : Précision du produit fini Azimycine®**

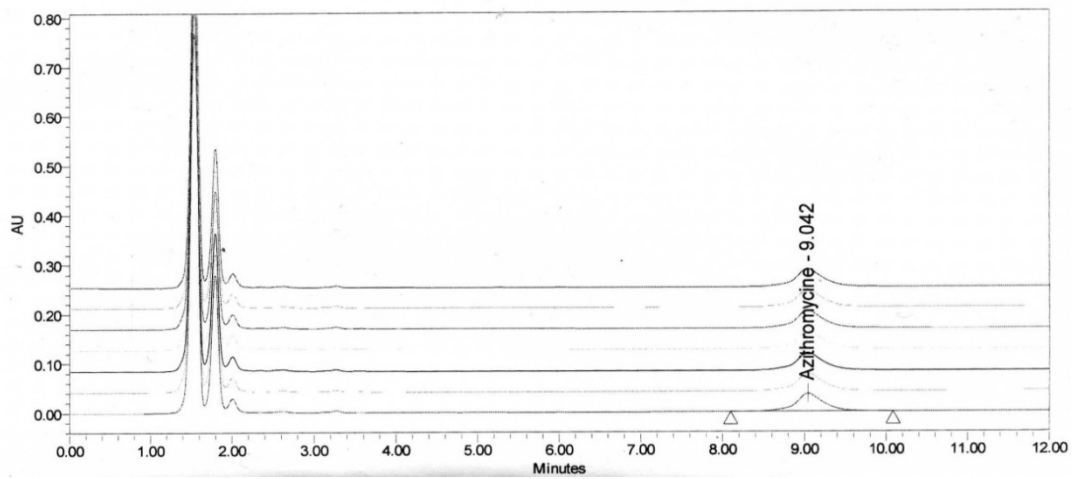
<b>Essai (J/E)</b>	<b>Concentration (%)</b>	<b>Aire des pics</b>	<b>Quantité retrouvée (%)</b>	<b>Recouvrement (%)</b>
<b>J1/1</b>	<b>100%</b>	880381	100,82	100,82
<b>J1/2</b>		884716	101,27	101,27
<b>J1/3</b>		888375	101,65	101,65
<b>J1/4</b>		876676	100,43	100,43
<b>J1/5</b>		883687	101,16	101,16
<b>J1/6</b>		878074	100,58	100,58
<b>J1/7</b>		878231	100,59	100,59
<b>J2/1</b>	<b>100%</b>	880660	100,85	100,85
<b>J2/2</b>		872425	99,99	99,99
<b>J2/3</b>		882937	101,08	101,08
<b>J2/4</b>		883269	101,12	101,12
<b>J2/5</b>		875017	100,26	100,26
<b>J2/6</b>		880523	100,83	100,83
<b>J2/7</b>		881843	100,97	100,97
<b>J3/1</b>	<b>100%</b>	876405	100,40	100,40
<b>J3/2</b>		879637	100,74	100,74
<b>J3/3</b>		875312	100,29	100,29
<b>J3/4</b>		878678	100,64	100,64
<b>J3/5</b>		880210	100,80	100,80
<b>J3/6</b>		858025	98,49	98,49
<b>J3/7</b>		879243	100,70	100,70

**(Voir annexe 6)**

1<sup>ère</sup> jour :



2<sup>ème</sup> jour :



3<sup>ème</sup> jour :

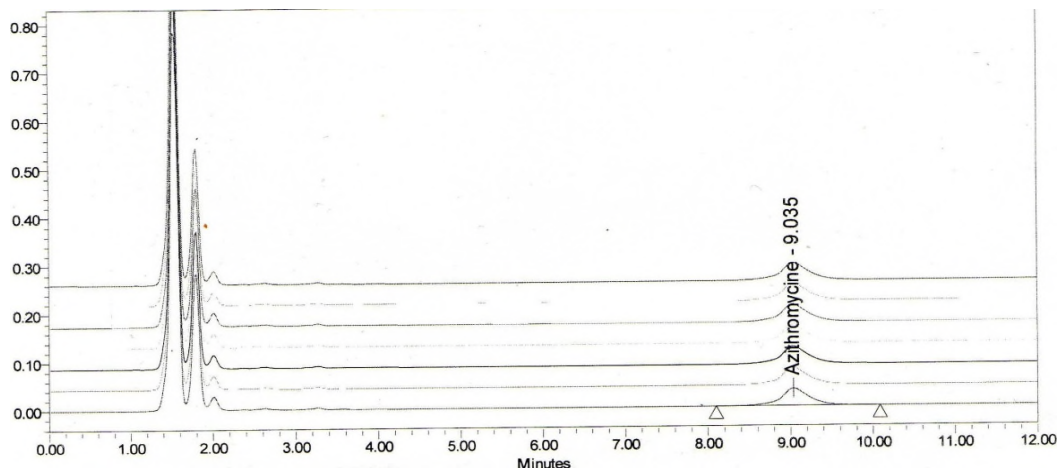


Figure V.9 : Chromatogrammes du critère de précision par rapport au produit fini à dilution 100%

**I.3.1. Vérification statistique de la précision (fidélité) du standard et du produit fini**

**a) Homogénéité des variances**

**Tableau V.19:** Homogénéité des variances pour le standard

$S_{2max}$	0,06373
<b>Somme des variances</b>	0,13397
$C_{calculé}$	0,47570
<b>K (nbr essais)</b>	3
<b>n (nbre répétition par essai)</b>	7
$C_{théorique\ 5\%}$	0,68
$C_{théorique\ 1\%}$	0,76
<b>Conclusion (<math>C_{calculé} &lt; C_{théorique}</math>)</b>	<b>Valide au risque 5%</b>

**Tableau V.20:** Homogénéité des variances pour le produit fini

$S_{2max}$	0,66753
<b>Somme des variances</b>	1,05289
$C_{calculé}$	0,63400
<b>K (nbr essais)</b>	3
<b>n (nbre répétition par essai)</b>	7
$C_{théorique\ 5\%}$	0,68
$C_{théorique\ 1\%}$	0,76
<b>Conclusion (<math>C_{calculé} &lt; C_{théorique}</math>)</b>	<b>Valide au risque 5%</b>

$C_{calculé}$  est inférieur à la valeur critique de la table au seuil 5% ; le test de COCHRAN est significatif, l'ensemble des variances peut être considéré comme homogène.

**b) Calcul de variances de répétabilité, intergroupe, reproductibilité, et coefficient de variance et moyenne générale**

Les résultats obtenus sont regroupés dans les deux tableaux suivants :

**Tableau V.21** : Résultats de calcul des variances de répétabilité, intergroupe, reproductibilité, et coefficient de variance et moyenne générale pour le standard

<b>Variance de répétabilité</b>	0,04466
<b>Variance intergroupes</b>	0,08556
<b>Variance de reproductibilité</b>	0,13021
<b>Moyenne générale de recouvrement</b>	100,42571
<b>CV répétabilité (&lt;3%)</b>	0,21%
<b>CV reproductibilité (&lt;6%)</b>	0,36%

**Tableau V.22** : Résultats de calcul des variances de répétabilité, intergroupe, reproductibilité, et coefficient de variance et moyenne générale pour le produit fini

<b>Variance de répétabilité</b>	0,35096
<b>Variance intergroupes</b>	0,05502
<b>Variance de reproductibilité</b>	0,40598
<b>Moyenne générale de recouvrement</b>	100,65048
<b>CV répétabilité (&lt;3%)</b>	0,59%
<b>CV reproductibilité (&lt;6%)</b>	0,63%

D'après les deux tableaux précédents, les coefficients de variances de répétabilité et de reproductibilité pour le standard et le produit fini sont dans les limites d'acceptation.

Les résultats restant dans les limites acceptables, confèrent à la méthode une bonne précision.

**I.4. Exactitude du standard et de l'échantillon (Azimycine®)**

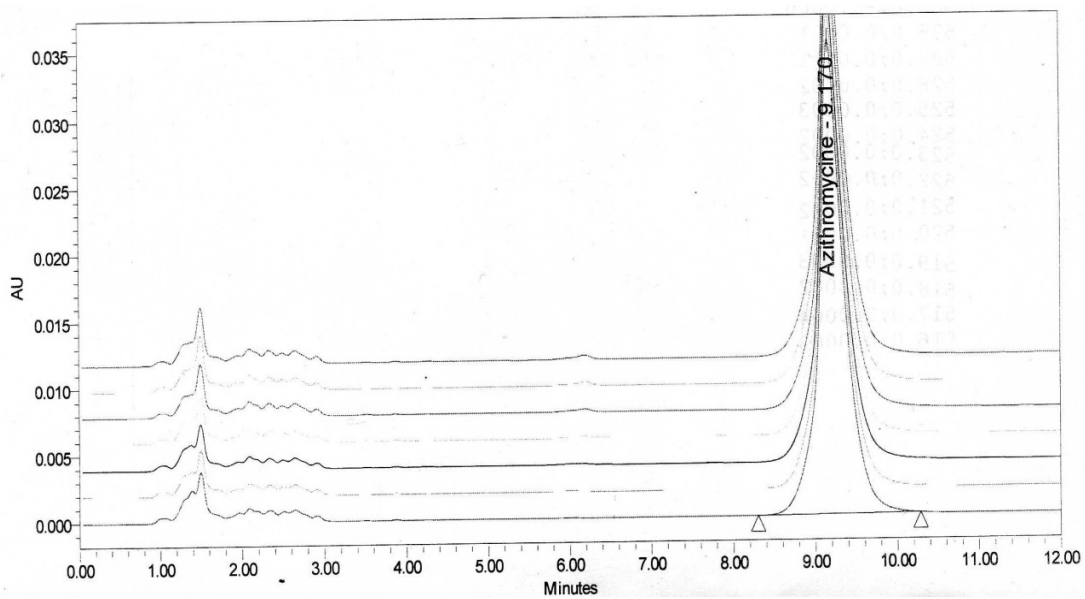
Pour évaluer l'exactitude de la méthode à valider, il est recommandé d'utiliser au moins 15 résultats obtenus par l'analyse de cinq (05) concentrations allant de 80% à 120% (résultats de la linéarité). Les résultats sont portés dans le tableau I.23.



**Tableau V.23:** Résultats du critère de l'exactitude de standard

Essai n°E/j	Concentration (µg/ml)	Air du pic (µV/seconde)	Quantité retrouvées	Recouvrement %	Nj	S2
1/1	80	657862	78,85	98,56	3	0,014467559
2/1		658764	78,96	98,70		
3/1		670071	80,37	100,46		
1/2	90	760916	91,68	101,87	3	0,014467559
2/2		751703	90,53	100,59		
3/2		750921	90,44	100,49		
1/3	100	826064	99,79	99,79	3	0,014467559
2/3		825931	99,78	99,78		
3/3		840289	101,56	101,56		
1/4	110	903150	109,39	99,45	3	0,014675563
2/4		898690	108,84	98,95		
3/4		897415	108,68	98,80		
1/5	120	991940	120,45	100,38	3	0,005486111
2/5		990940	120,32	100,27		
3/5		990559	120,28	100,23		

(Voir annexe 7)



**Figure V.10 :** Chromatogramme du critère de l'exactitude de standard à 90%

Tableau V.24 : Résultats du critère de l'exactitude de produit fini

Essai n°E/j	Concentration (µg/ml)	Air du pic (µV/seconde)	Quantité retrouvées	Recouvrement %	Nj	S2
1/1	80	716724	83,79	104,74	3	0,014467559
2/1		688413	80,84	101,05		
3/1		678196	79,78	99,73		
1/2	90	769097	89,24	99,16	3	0,014467559
2/2		770439	89,38	99,31		
3/2		768749	89,20	99,11		
1/3	100	853689	98,04	98,04	3	0,014467559
2/3		853578	98,03	98,03		
3/3		856390	98,32	98,32		
1/4	110	956745	108,79	98,87	3	0,014675563
2/4		961624	109,27	99,34		
3/4		987109	111,92	101,75		
1/5	120	1078582	121,44	101,20	3	0,061736111
2/5		1072922	120,85	100,71		
3/5		1075073	121,07	100,89		

(Voir annexe 8)

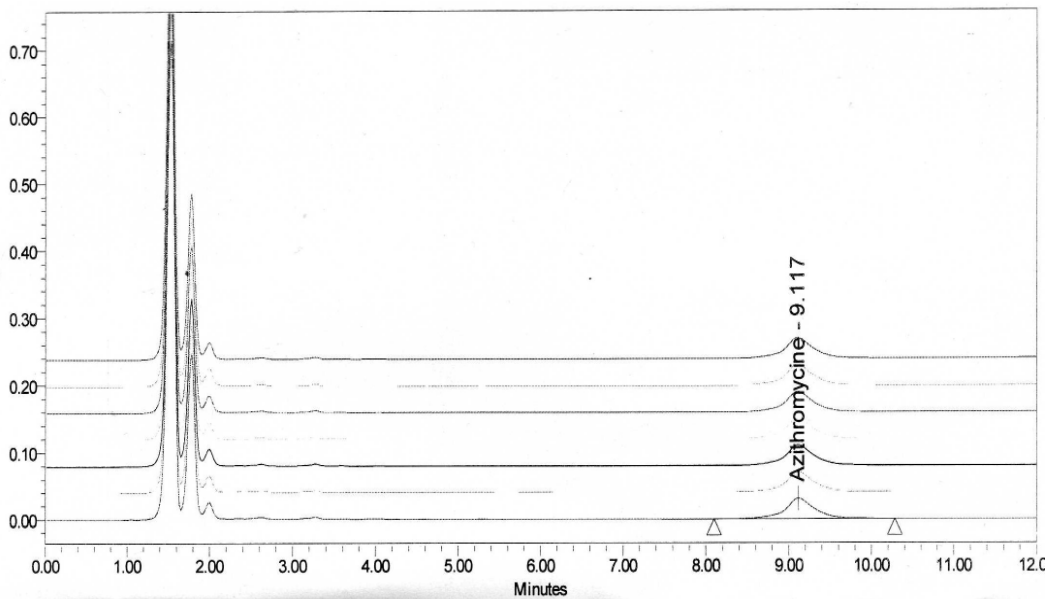


Figure V.11 : Chromatogramme du critère d'exactitude pour le produit fini à 90%

**I.4.1. Vérification statistique de l'exactitude de standard et de produit fini (Azimycine<sup>®</sup>)**

**a) Homogénéité des variances**

On a procédé de la même manière que dans le cas de linéarité (les formules et tests), on a obtenus les résultats suivants :

**Tableau V.25 : Homogénéité des variances du standard**

<b>S<sub>2max</sub></b>	0,01468
<b>Somme des variances</b>	0,06356
<b>C<sub>calculé</sub></b>	0,23088
<b>C<sub>théorique 5%</sub></b>	0,68
<b>C<sub>théorique 1%</sub></b>	0,79
<b>Conclusion (C<sub>calculé</sub> &lt; C<sub>théorique</sub>)</b>	<b>Valide au risque 5%</b>

L'homogénéité des variances est considérée comme homogène au risque **5%**.

**Tableau V.26 : Homogénéité des variances du produit fini**

<b>S<sub>2max</sub></b>	0,06174
<b>Somme des variances</b>	0,11981
<b>C<sub>calculé</sub></b>	0,51526
<b>C<sub>théorique 5%</sub></b>	0,68
<b>C<sub>théorique 1%</sub></b>	0,79
<b>Conclusion (C<sub>calculé</sub> &lt; C<sub>théorique</sub>)</b>	<b>Valide au risque 5%</b>

L'homogénéité des variances est vérifiée au risque **5%**.

**b) Test de validité des moyennes**

Ce test consiste à étudier l'homogénéité des moyennes intragroupe et intergroupe, les résultats obtenus sont portés dans le tableau suivant :

**Tableau V.27 : Test de validité des moyennes pour le standard**

	<b>DDL</b>	<b>Somme des carres</b>	<b>Variance</b>	<b>F<sub>1</sub> calculé</b>	<b>F1 théorique 5%</b>	<b>F1 théorique 1%</b>	<b>conclusion</b>
<b>Variation Totale</b>	14	13,69122	0,97794	0,00347	3,48	5,99	Valide au risque 5%
<b>Variation Intragroupe</b>	10	5,76613	0,57661				
<b>Variation Intergroupe</b>	4	7,92509	0,00200				

**Tableau V. 28: Test de validité des moyennes pour le produit fini**

	<b>DDL</b>	<b>Somme des carres</b>	<b>Variance</b>	<b>F<sub>1</sub> calculé</b>	<b>F1 théorique 5%</b>	<b>F1 théorique 1%</b>	<b>conclusion</b>
<b>Variation Totale</b>	14	43,63561	3,11683	0,00108	3,48	5,99	Valide au risque 5%
<b>Variation Intragroupe</b>	10	18,44962	1,84496				
<b>Variation Intergroupe</b>	4	25,18598	0,0020				

**c) Estimation du recouvrement moyen :**

**Tableau V.29 :** Estimation de recouvrement moyen pour le standard

<b>Recouvrement moyen %</b>	99,991	
<b>Intervalle de confiance %</b>	99,44	100,54

**Tableau V.30:** Estimation de recouvrement moyen pour le produit fini

<b>Recouvrement moyen %</b>	100,016	
<b>Intervalle de confiance %</b>	99,04	100,99

**I.5. La limite de détection et de quantification**

**Tableau V.31 :** Résultats de la limite de détection et de quantification de standard

<b>Concentration (%)</b>	<b>Concentration MG/ML</b>	<b>LD Azithromycine</b>	<b>LQ Azithromycine</b>
100	1	+	+
10	0,1	+	+
1	0,01	+	-
0,1	0,001	-	-
0,01	0,0001	-	-
0,001	0,00001	-	-
0,0001	0,000001	-	-

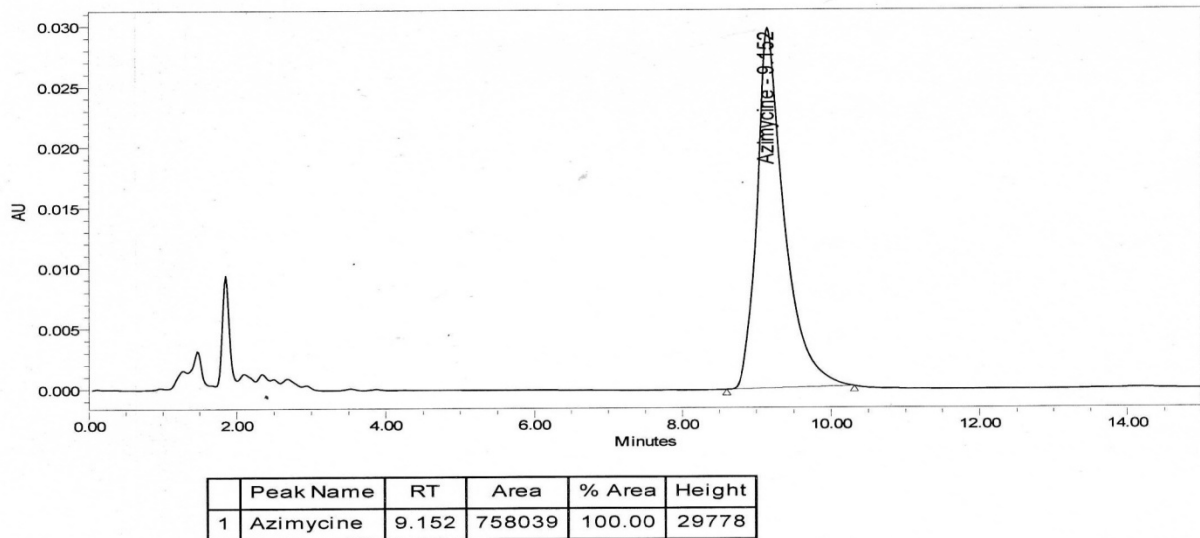
**(Voir annexe 9)**

+ : Le principe actif est détecté/quantifié.

- : Le principe actif n'est pas détecté / quantifier.

LD : Limite de détection.

LQ : Limite de quantification.



**Figure V.12** : Chromatogramme du Standard à la concentration de 1 mg/ ml

$$LD \geq 10^{-2} \text{ mg/ml}$$

$$LQ \geq 10^{-1} \text{ mg/ml}$$

D'après le tableau, le principe actif Azitromycine est détecté jusqu'à la concentration  $10^{-2}$  mg/ml, alors qu'il reste sous forme de trace à partir de concentration  $10^{-3}$  mg/ml (non quantifiable) (Voir annexe 9).

La série d'expérience effectuée pour valider la méthode de dosage du principe actif permet de conclure que les paramètres de validation répondent aux critères d'acceptation et la méthode d'analyse par HPLC est considéré valide.

### I.6. Application de dosage par HPLC sur le produit fini

Le dosage et la dissolution du produit Azimycine<sup>®</sup> a été effectué dans les mêmes conditions chromatographies, la même procédure de préparation des solutions à été appliquée.

$$\text{Titre (mg/ 5ml)} = \frac{\text{Aire (ech)}}{\text{Aire (STD)}} * [\text{STD}] * \frac{\text{pesée (STD)}}{\text{pesée (ech)}} * \frac{\text{Titre (\%)}}{100} * \frac{PM}{V_F} * V_F$$

**Avec :**

Aire (ech) : Aire d'échantillon de produit fini Azimycine®.

Aire (STD) : Aire de standard.

[STD] : Concentration de standard.

Pesée (STD) : La pesée de standard en (mg).

Pesée (ech) : La pesée d'échantillon en (mg).

Titre (%): Titre massique du standard en (%) (97,3 %).

PM : Poids moyen du contenu de poudre : 10,8 à 13,2 g/flacon (12000 mg/).

V<sub>F</sub>: Volume théorique par flacon (15 ml).

V<sub>P</sub> : Volume théorique par prise unitaire (pour 200 mg d'Azithromycine) = 5 ml.

## **II. Validation biopharmaceutique de la méthode de dissolution de produit fini Azimycine®**

Les résultats obtenus sont portés dans les tableaux suivants:

**Tableau V.32 : Dosage du principe actif dans le produit fini par (Profil de dissolution)**

N° d'échantillons	Temps (min)							
	5 (min)		15 (min)		30 (min)		45 (min)	
	t <sub>r</sub> (min)	Air du pic	t <sub>r</sub> (min)	Air du pic	t <sub>r</sub> (min)	Air du pic	t <sub>r</sub> (min)	Air du pic
Essai 1	9,418	119415	9,362	194058	9,360	207723	9,370	211894
Essai 2	9,421	119091	9,365	185274	9,365	202979	9,375	208754
Essai 3	9,418	129289	9,365	193862	9,361	206945	9,374	213824
Essai 4	9,421	119748	9,368	198650	9,359	210605	9,375	215951
Essai 5	9,414	129066	9,363	198549	9,362	207164	9,382	224776

Les résultats obtenus du standard (témoin) sont portés dans le tableau suivant :

**Tableau II.33** : Dosage du standard (témoin) par HPLC

	Nombre d'injections	Temps de rétention (min)	Aire du pic
Standard (témoin)	1	9,452	165216
	2	9,458	165021
	3	9,464	165801
	Moyenne	9,458	165345,9

### II.1. Formule de calcul pour le taux de dissolution

$$\% \text{ dissolution} = \frac{\text{Aire (ech)}}{\text{Aire (STD)}} * \frac{V_{\text{diss}}}{\text{pesée (ech)}} * \frac{V_F}{V_P} * [\text{STD}] * \text{Titre (\%)}$$

**Avec :**

Aire (ech) : Aire d'échantillon de produit fini Azimycine®.

Aire (STD) : Aire de standard.

V<sub>diss</sub> : Volume de dissolu- test (900 ml).

Pesée (ech) : La pesée d'échantillon en (mg).

V<sub>F</sub>: Volume théorique par flacon (15 ml).

V<sub>P</sub> : Volume théorique par prise unitaire 5 ml (pour 200 mg d'Azithromycine).

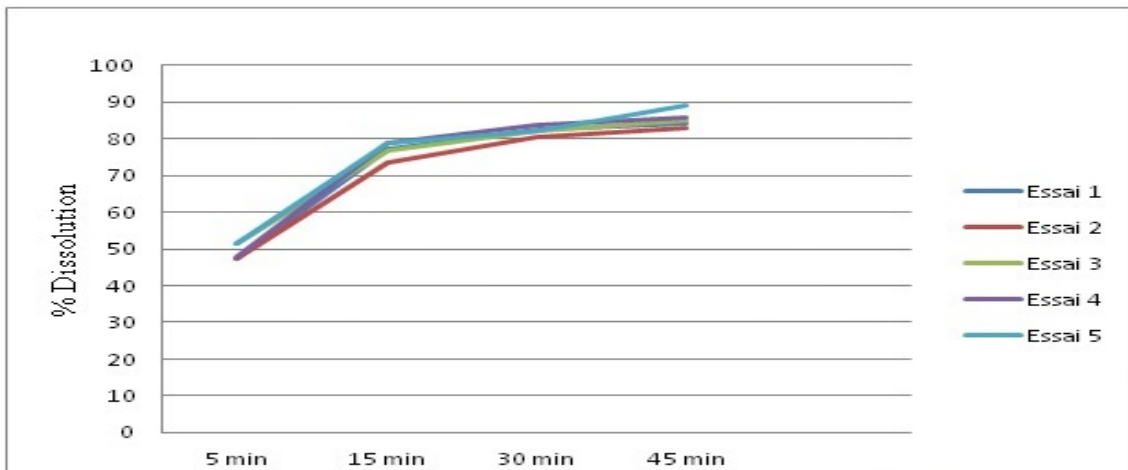
[STD] : Concentration de standard.

Titre (%): Titre massique du standard en (%) (97,3 %).



**Tableau II.34** : Résultats de calcul du taux de dissolution du principe actif Azitromycine

$t_{diss}$ (min)	Taux de dissolution (%)			
	5 min	15 min	30 min	45 min
Essai 1	47,43	77,08	82,51	84,17
Essai 2	47,30	73,59	80,62	82,92
Essai 3	51,35	77,00	82,20	84,93
Essai 4	47,56	78,91	83,65	85,78
Essai 5	51,27	78,87	82,29	89,28
Moyenne	48,98	77,09	82,25	85,42



**Figure II. 13** : Profil de dissolution du principe actif Azitromycine en fonction de temps

**Interprétation :**

L'analyse par HPLC des échantillons du produit fini prélevés au cours du test de dissolution montre que le profil de dissolution du produit étudié correspond à celui d'une forme à libération conventionnelle puisque une quantité supérieure à 80% de principe actif est libérée au bout de 45 min qui est une limite minimale de la norme de l'USP [32]. Le test de dissolution de la suspension buvable Azimycine<sup>®</sup> de 200 mg/ 5 ml est conforme aux normes exigées.

## II.2. Contrôle analytique et biopharmaceutique du produit fini Azimycine®

Après validation analytique de la méthode du dosage du principe actif dans le produit fini Azimycine®, suspension buvable à 200mg/5ml, nous avons appliqué la méthode d'analyse pour le contrôle analytique et biopharmaceutique du produit fini. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau II.35.

**Tableau II.35:** Contrôle analytique et biopharmaceutique du produit fini Azimycine®

Paramètre	Produit fini Azimycine® 200 mg/5ml	Normes [32]
Titre du PA (mg/ 5ml)	214,07	180 à 220
Taux de dissolution du PA (%)	85,42	≥ 80 %
Poids moyen du PF (g/ flacon)	12	10,8 à 13,2

Les résultats obtenus pour les paramètres d'analyse mesurés pour le produit fini Azimycine® suspension buvable à 200mg/5ml sont conformes aux normes exigées par l'USP.



# Conclusion générale

Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à la validation analytique et biopharmaceutique d'une suspension buvable à base d'un antibiotique « Azithromycine » par la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

La validation de la méthode de dosage du principe actif par HPLC, concerne la vérification des critères suivants : spécificité, linéarité, précision, l'exactitude, limite de détection et limite de quantification.

La validation biopharmaceutique du produit fini permet la vérification du test de dissolution c'est à dire le pourcentage de principe actif dissout en fonction du temps.

Les résultats obtenus ont montrés que la méthode est spécifique pour le principe actif Azithromycine, présente un profil linéaire valide et elle est exacte. Les résultats de répétabilité et de reproductibilité des essais sont valides, ce qui implique que la méthode est précise.

En outre, les résultats trouvés dans l'application au produit fini de la méthode de dosage sont adéquats, ce qui confirme l'étude de validation de la méthode de dosage d'analyse.

Les résultats obtenus de la dissolution du « Azimycine<sup>®</sup> » sont conformes aux normes décrites par l'USP 25<sup>e</sup> édition. En effet, le taux du PA libéré par « Azimycine<sup>®</sup> » est aux alentours de 80% après 45 minutes de dissolution. Ces résultats sont en parfait accord avec les spécifications de l'USP qui exige un taux de libération supérieur à 80 % au bout de 45 minutes ce qui permet de classer cette forme galénique comme étant une forme à libération conventionnelle.

Au terme de ce travail, nous pouvons donc conclure que la méthode de dosage par HPLC est fiable, puisque elle a été validée par les trois tests statistiques de Student, Fisher et Cochran. Et par conséquent peut être appliquée dans les analyses de routine du produit fini pour la libération des lots fabriqués.



Référence bibliographique

## Références bibliographiques

- [1] Jean Paul LARPENT, Jean Jacques SANGLIER, Biotechnologie des antibiotiques, 2<sup>ème</sup> Edition MASSON, 1989.
- [2] J.P. Euzéby : Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale.
- [3] J. M. Aiache, E. Beyssac / J.-M. Cardot, V. Hoffard / R. Renoux Initiation à la connaissance du médicament, 5<sup>e</sup> édition, 2008.
- [4] J. C. Chaurell, Brossard, Abrégé de la pharmacie galénique, Bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 8<sup>e</sup> édition, 2001.
- [5] Pharmacopée européenne 6.0, 2006.
- [6] G. Houin, Pharmacocinétique, support de l'enseignement de la pharmacologie générale, édition ellipse, 1990.
- [7] A. Douglas, F. Scoog, J. Holler, A. Nieman, Chimie Analytique, 7<sup>e</sup> édition, 1997.
- [8] D. R-Browning, Méthodes spectroscopiques, édition Masson, 1974.
- [9] Rouessac Francis, Rouessac Annic, Analyse chimiques, Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6<sup>e</sup> Edition, 2004, p (14 – 49).
- [10] T. Teissier, N. Madet, Compte rendu de TP de spectrophotométrie UV-Visible, université de Créteil ; paris XII, Licence IUP SIAL, 2004.
- [11] Rouessac Francis, Rouessac Annic, Gruche D., « Analyse chimique. Méthodes et technique instrumentales modernes » 2<sup>e</sup> Edition : Dunod. 2004.
- [12] A. Pryde, M.T Gilbert, Application of high performance liquid chromatography. John Wilyandsons, New York, 1979.
- [13] W.J. Munson, Pharmaceutical analysis: Modern Methods, Part B, 1984.
- [14] Y.Shen, R.D. Smith, Electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography, TELEDYNE ISCO, 2008.

- [15] J. J. Kirland, Chromatographie en phase liquide, Pratique et applications modernes, Edition Gauthier-Villars, Paris, 1973.
- [16] René Laffont, Biologie et multimédia. Université Pierre et Marie Curie- UFR de biologie, 28 juin 2005.
- [17] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, Chromatographie en phase liquide et supercritique, Deuxième édition Masson, 1991 p (224-235).
- [18] S. Lindsay, High Performance Liquid Chromatography, Acol. London, (1987) P 244.
- [19] Document de la validation des méthodes d'analyse, groupe SAIDAL FILIALE BIOTIC (Adopté : Aout 1989).
- [20] M. Guemet, M. Hamon Abergé de chimie analytique. Tome 1, chimie des solutions, 2<sup>ème</sup> Édition, 1991, P 238.
- [21] Feinberg Max, Guide de validation des méthodes physico-chimique. Edition 2004.
- [22] Programme des produits thérapeutiques. Ottawa 12 février 1999.
- [23] Le guide d'assurance qualité et de traçabilité (l'AQT), 1996.
- [24] J. M. Green, A partical guide to analytical method validation, Anal. Chem.68, 1996.
- [25] J. Fleury, Introduction à l'usage des méthodes statistiques en pharmacie, Editions médecine hygiène, Genève, 1987.
- [26] C. Bourdillon, Notions de base sur les incertitudes et le traitement des données expérimentales en physique, chimie et biologie, Version juillet 2001.
- [27] J. Bailly, Stratégie de validation nettoyage en industrie chimique et pharmaceutique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Lyon : Université Claude Bernard-Lyon I, 2004, p 126.
- [28] J. J. Droesbek, Elément statistique. Office des publications universitaire (OPU), Alger, 1988.
- [29] Documentation Saida, Le dossier pharmaceutique de l'Azithromycine®.

[30] A. Douglas, F. Scoog, James Holler, Timothy A. Neiman, Principes d'analyse instrumentale. Traduction et révision scientifique de la 5<sup>ième</sup> édition Américaine par Glandine Heian et Freddy Demonti, De Boeck, Paris 2003.

[31] Philippe Lechat. Pharmacologie DCEMI 2006-2007, Université Paris-VI.

[32] U.S. PHARMACOPEIA 25 édition NF 30.





# Annexes

## **I. Historique de groupe SAIDAL :**

L'entreprise Sidal a été créée en 1985, suite à la dissolution de la pharmacie Centrale Algérienne créée en 1977. A cet horizon, l'entreprise disposait de trois unités de production sises Gué de Constantine, Dar EL Beida et El-Harrach.

A la faveur des réformes économiques initiées en Algérie dans les années 80, l'entreprise Nationale de production Pharmaceutique Sidal, est transformée en Entreprise publique économique (EPE).

Le 15 février 1989, Sidal est passée à l'autonomie et est érigée en Société par action (SPA).

En 1993, des changements ont été apportés aux statue de l'entreprise, lui permettant de participer à toutes opérations industrielles et commerciales pouvant se rattacher à l'objet sicial, par voie de création de sociétés nouvelles ou filiales.

Plus tard et dans le cadre de la politique de filialisation, Sidal est érigée en groupe industriel par décision de l'assemblée générale extraordinaire (AGEX) du 27 juillet 1997.

## **II. Présentation et organisation :**

Le groupe Sidal est propriétaire de trois filiales :

- La filiale Antibiotical comprenant le complexe antibiotique de Médéa ;
- La filiale pharml comportant les unités de dar El Beida, d'Annaba et de Constantine ;
- La filiale biotic avec ses unités d'El-Harrach, de gué de Constantine et de cherchel ;

Les 3 centres de distribution régionaux, la direction commerciale, la direction de marketing et de l'information médicale ainsi que le centre de recherche et développement sont rattachées à la société mère.

En outre, Sidal dispose de portefeuilles dans plusieurs sociétés mixtes, avec Pfizer, Sanofi-Aventis, GPE, Dar-eddawa (collyre), Taphco (fil chirurgical), ainsi que dans des partenariats " public privé" (Solupharm...).

Aujourd'hui, le groupe saidal est une SPA au capital de 2,5 milliards de dinars, dont 20% appartiennent à des petits porteurs privés, acquis lors de l'opération d'entrée en Bourse de l'entreprise en 1998.

Sa mission principale est de développer, produire et commercialiser des produits pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire.

Le groupe Saidal est l'un des principaux producteurs de médicament en Algérie et contribue fortement à l'augmentation de la production nationale en mettant à la disposition des pouvoirs publics et de citoyen algérien une large gamme produit des produits pharmaceutiques riche de plus de 170 médicaments génériques répartis en 17 classes thérapeutiques.

Son chiffre d'affaire en 2005 avoisine les 100 millions d'euros. Saidal emploie à ce jour plus de 4100 employés.

### **III. Filiale ANTIBIOTICAL de Médéa :**

#### **III.1. Présentation :**

En 1997, l'entreprise Saidal a mise en œuvre un plan de restructuration qui s'est traduit par sa transformation le 02 février 1998 en groupe industriel SAIDAL, ainsi le complexe d'antibiotique est devenu **antibiotical Médéa** filiale du groupe Saidal.

Antibiotical est située à Médéa, 100km du sud d'Alger, s'étend sur une superficie de 25ha dont plus de 19ha couverts, spécialisée dans la production des antibiotiques pénicilliniques et non pénicilliniques, dotée de toutes les installations nécessaires à la fabrication du médicament depuis l'obtention du principe actif jusqu'à la mise en forme galénique du produit à savoir :

#### **a. Une unité à la pointe de la biotechnologie pour la production des principes actifs pénicilliniques et non pénicilliniques par :**

La production de fermentation est de 1200mètres cube pour une production de 750 tonnes de matière premières.

Elle dispose de deux unités de semi synthèse pour les produits oraux et stériles injectables.

**b. une unité des spécialités pharmaceutiques :**

Qui comprend deux bâtiments séparés l'un pénicilliniques, l'autre non pénicilliniques pour la fabrication des différents formes pharmaceutiques d'une capacité de 60 millions d'unité dont : 50% en injectables, 30% en forme sèches (comprimés, gélules, poudre pour sirop), 15% en forme pâteuses (crèmes et pommades), 5% en soluté buvables (sirops).

Elle est dotée aussi de quatre (4) enceintes stériles Z.A.C (zone à atmosphère contrôlée) de classe 100, cette forme constitue une spécificité d'antibiotical.

Plus deux grands magasins à air conditionné conçus pour le stockage approprié des matières premières, articales de conditionnement et des produits finis.

**c. Une imprimerie :**

dotée d'une capacité de production de plus de 80 millions d'étuis et de 140 millions de notices par an, de conditionnement et ceux des autres filiales du groupe SAIDAL.

En plus de cette activité, elle assure d'autres formes de prestations en dehors du groupe.

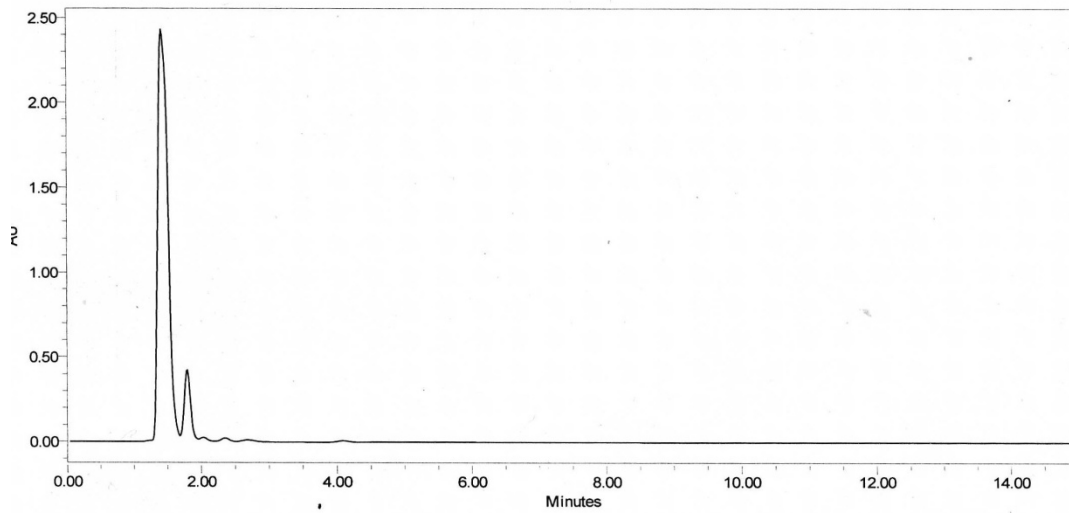
**d. Laboratoire de contrôle de qualité :**

Chargés de s'assurer de la conformité des matières premières, des produits semi finis et des produits finis, du suivi analytique de différentes phases du processus de fermentation dans le but d'améliorer les performances des souches microbiennes et interviennent dans la recherche et développement galénique, ainsi que le contrôle de qualité, partie intégrante des bonnes pratiques de fabrication qui constituent le référentiel pharmaceutique réglementaire pour tout établissement assurant la fabrication des médicaments.

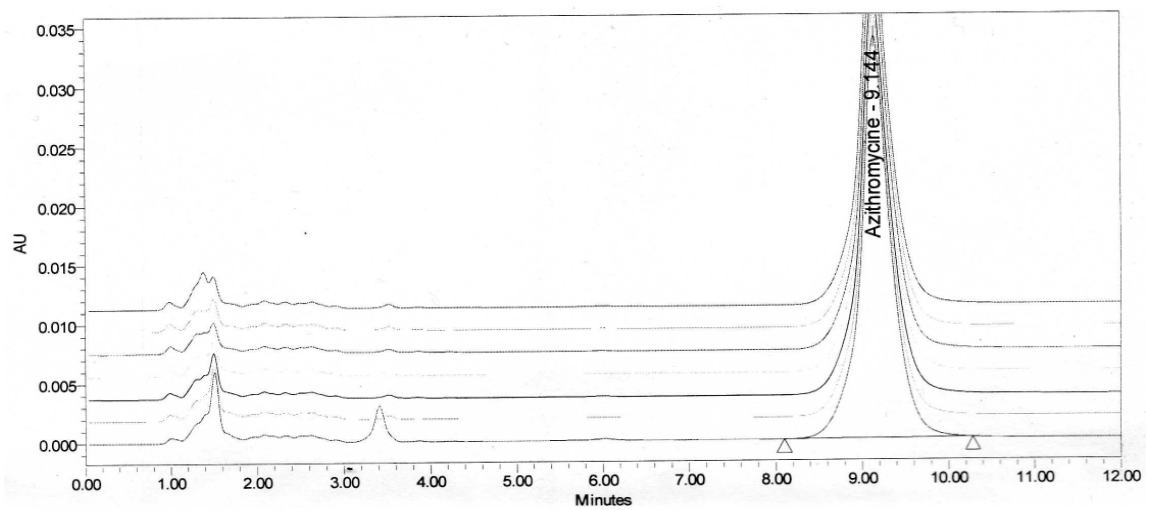
En plus, on trouve :

- **Une centrale de la Maintenance et une unité des services auxiliaires.**
- **Une station de traitement des effluents.**

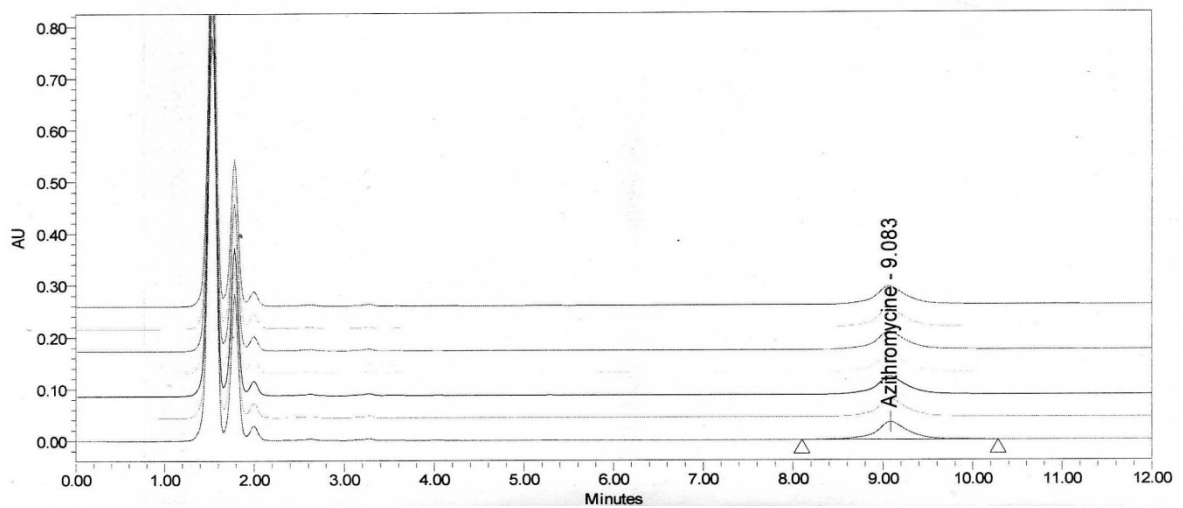
Chromatogramme du critère de spécificité pour le placebo :



Chromatogramme du critère de spécificité pour le standard à 100 % :

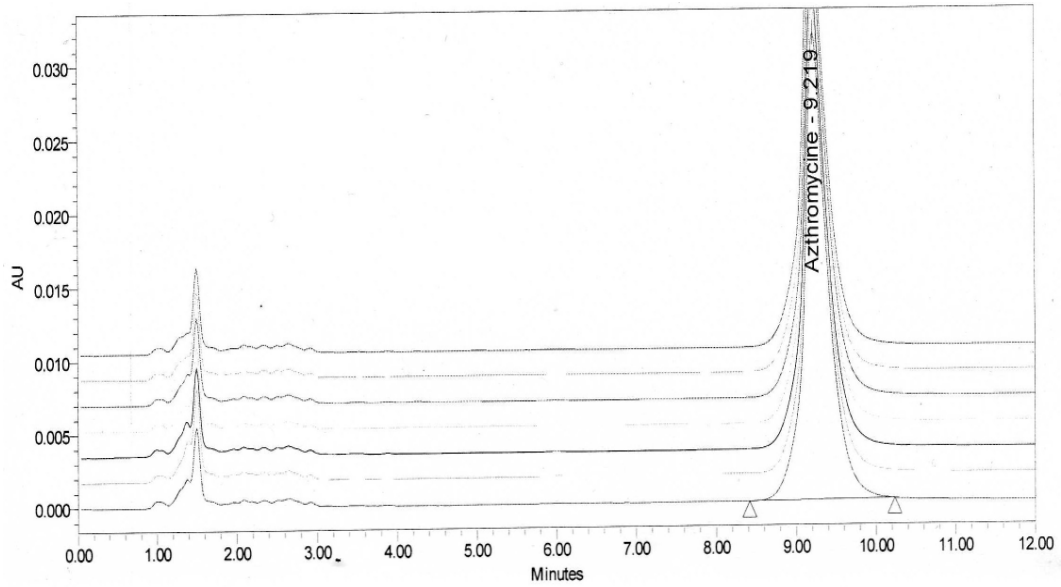


Chromatogramme du critère de spécificité pour le produit fini à 100 % :

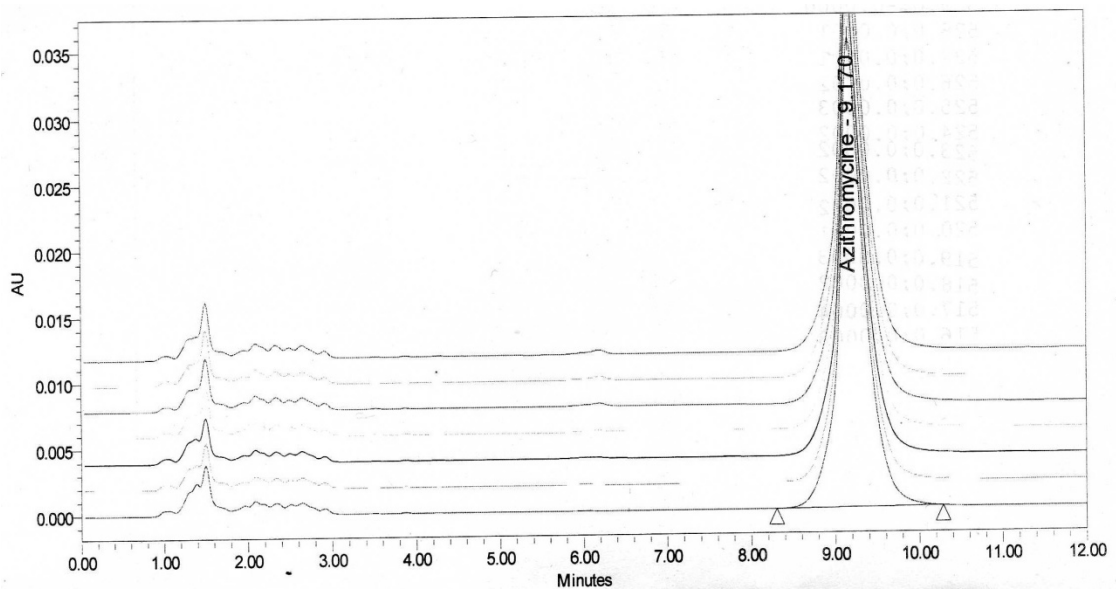


Les chromatogrammes du critère de linéarité par rapport au standard.

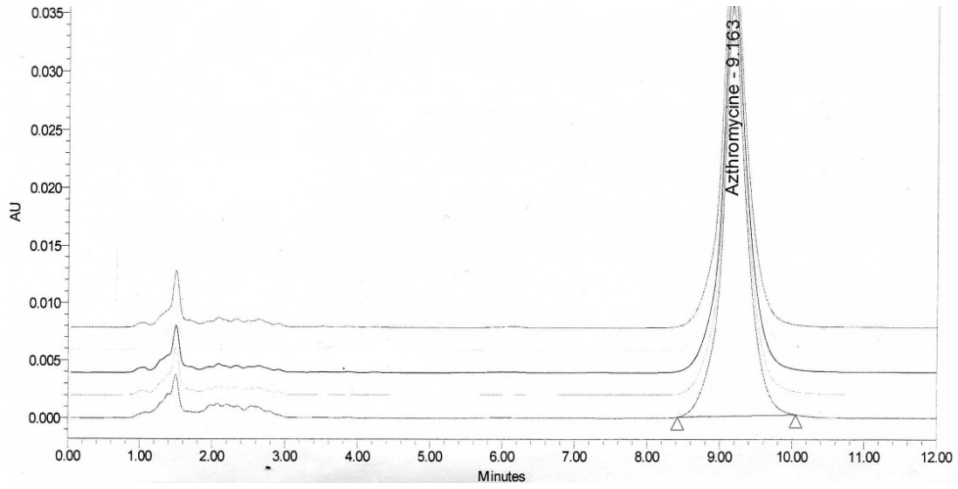
Chromatogramme du critère de linéarité de Standard à 80 % :



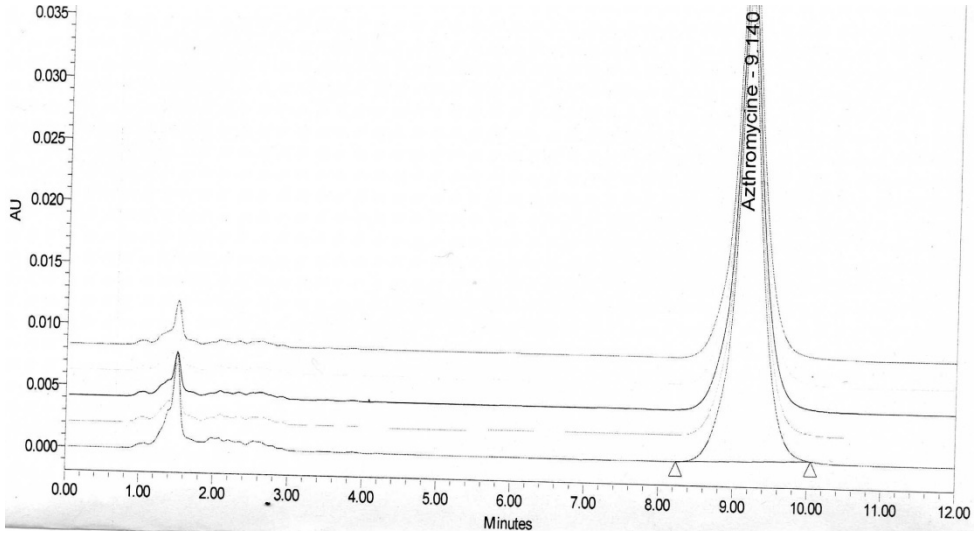
Chromatogramme du critère de linéarité de Standard à 90 % :



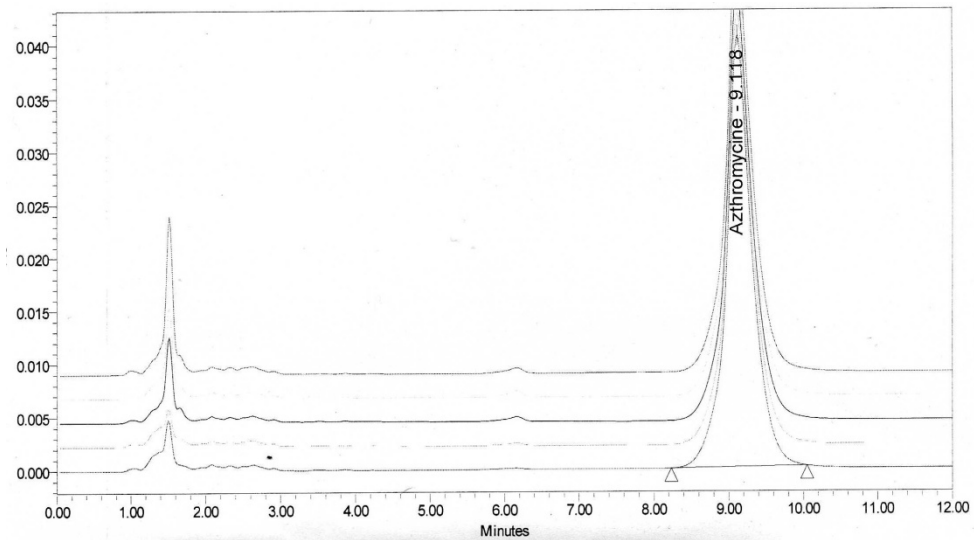
Chromatogramme du critère de linéarité de Standard à dilution 100 % :



Chromatogramme du critère de linéarité de Standard à dilution 110 % :

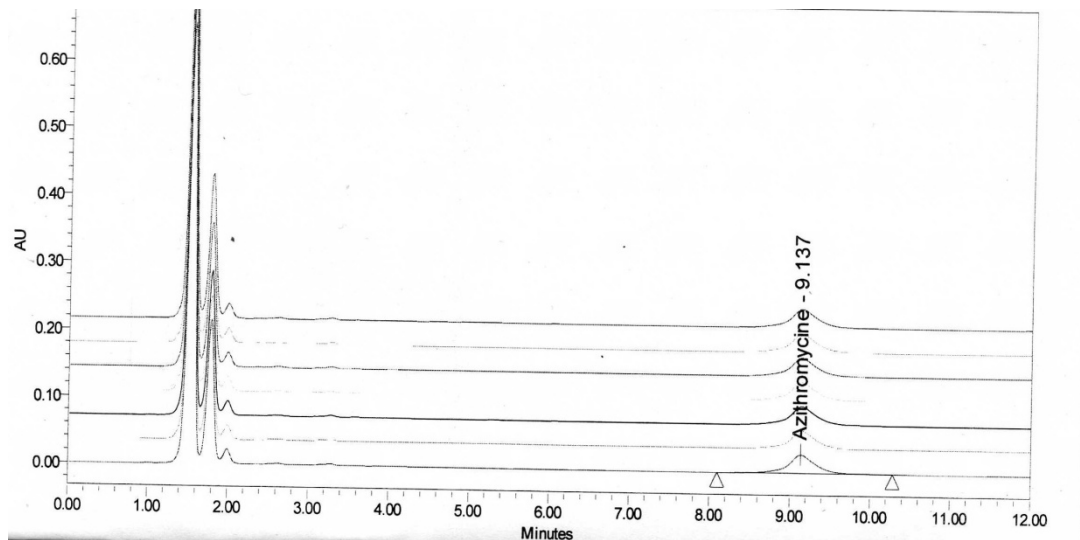


Chromatogramme du critère de linéarité de Standard à 120 % :

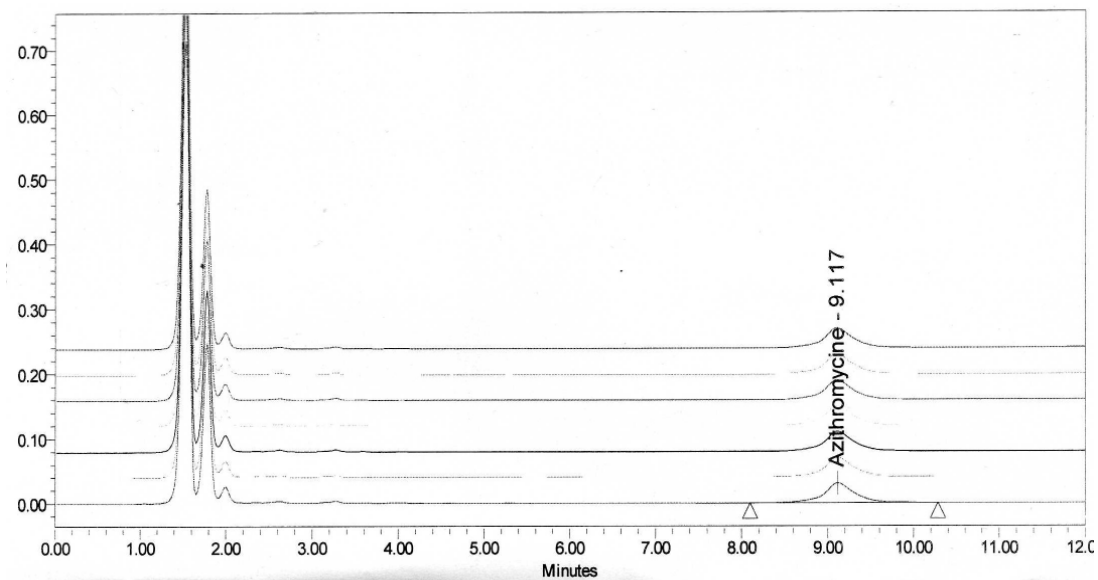


**Les chromatogrammes du critère de linéarité par rapport au standard :**

Chromatogramme du critère de linéarité de produit fini à 80 %

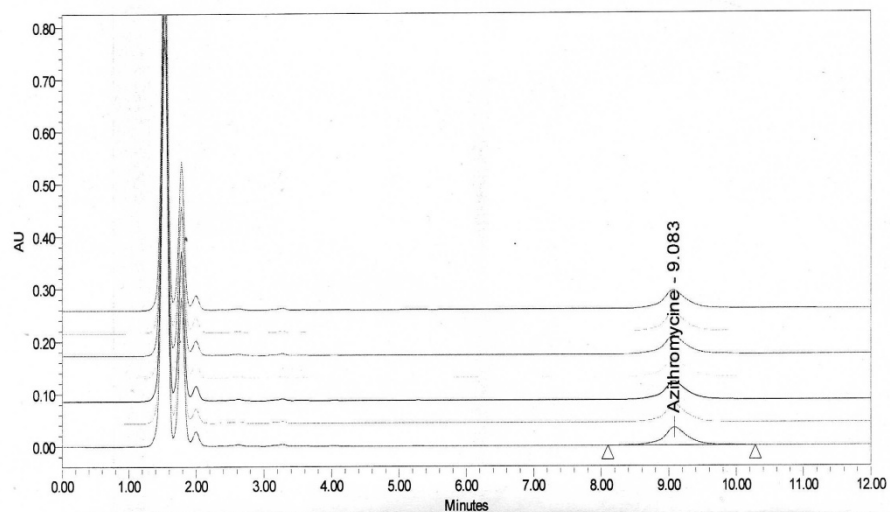


Chromatogramme du critère de linéarité de produit fini à 90 %

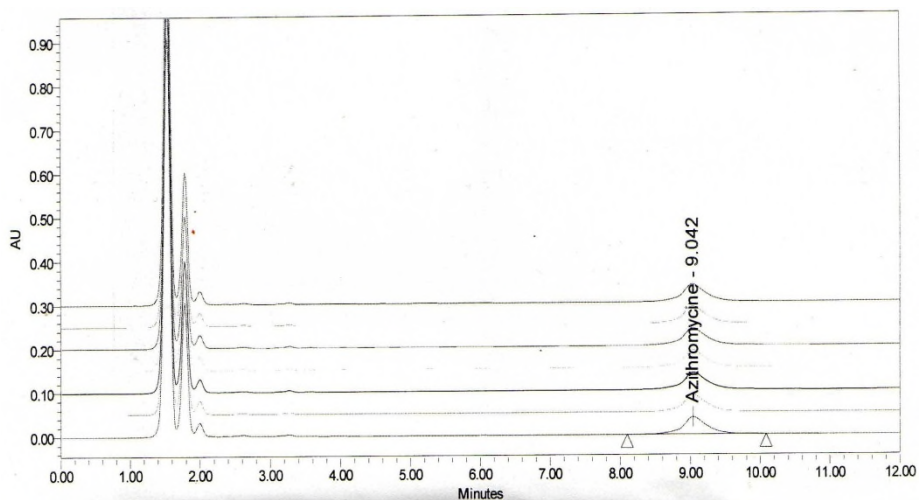




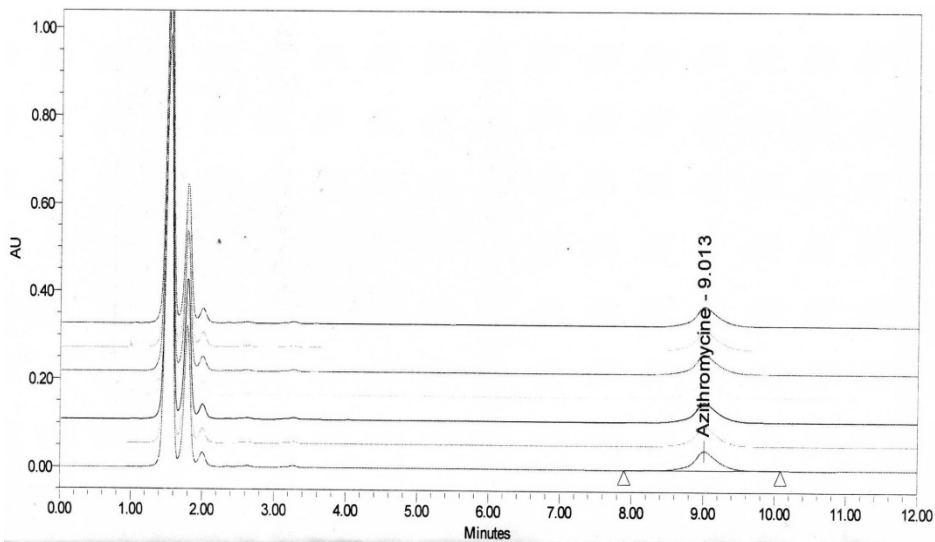
Chromatogramme du critère de linéarité de produit fini à 100 % :



Chromatogramme du critère de linéarité de produit fini à 110 % :

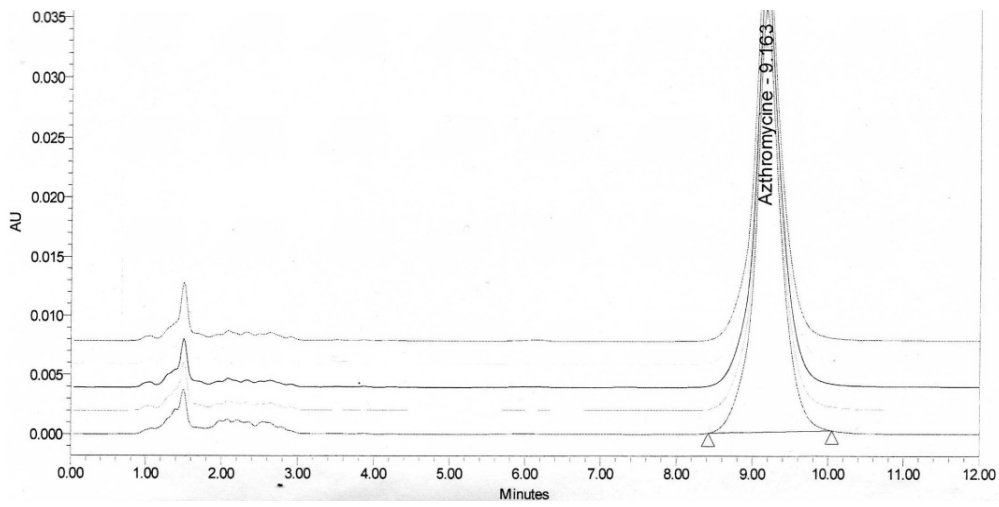


Chromatogramme du critère de linéarité de produit fini à 120 % :

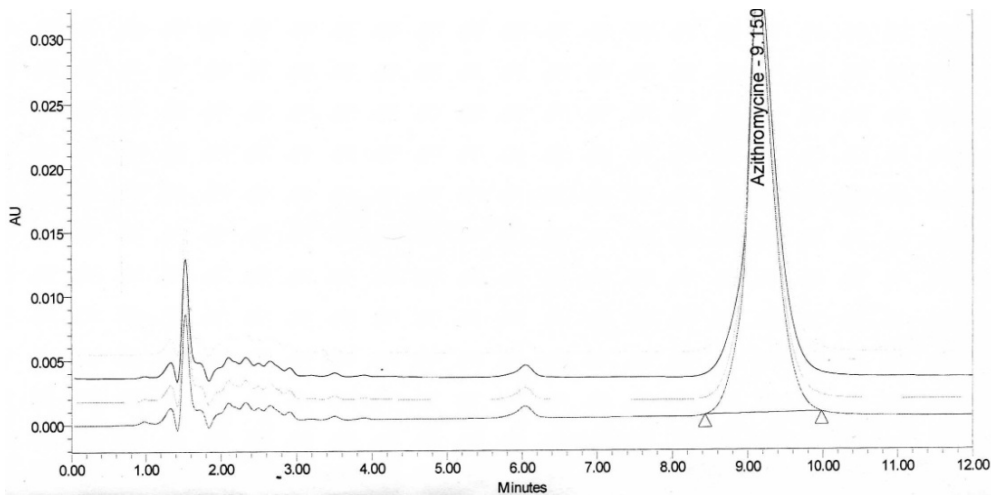


Les chromatogrammes du critère de précision par rapport au standard à 100% :

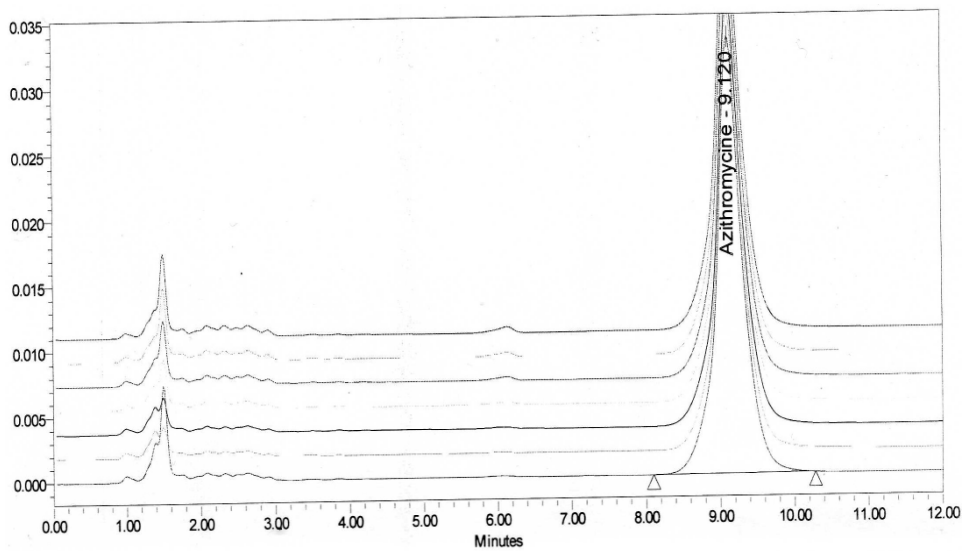
1<sup>ère</sup> jour :



2<sup>ème</sup> jour :

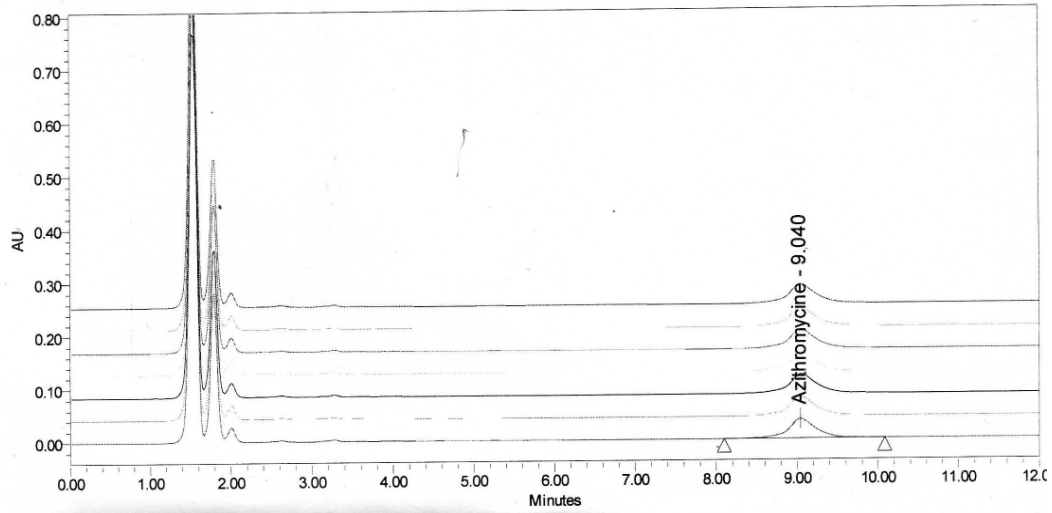


3<sup>ème</sup> jour :

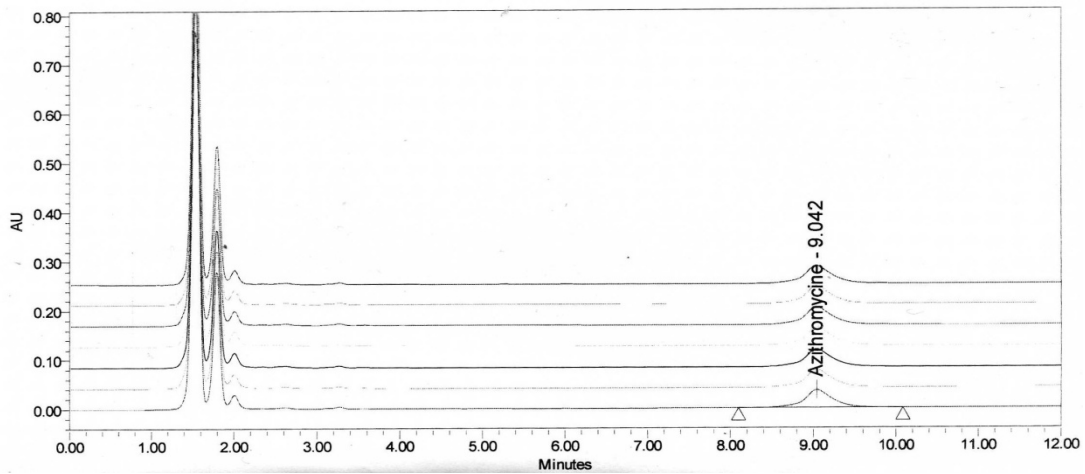


Les chromatogrammes du critère de précision par rapport au produit fini à 100% :

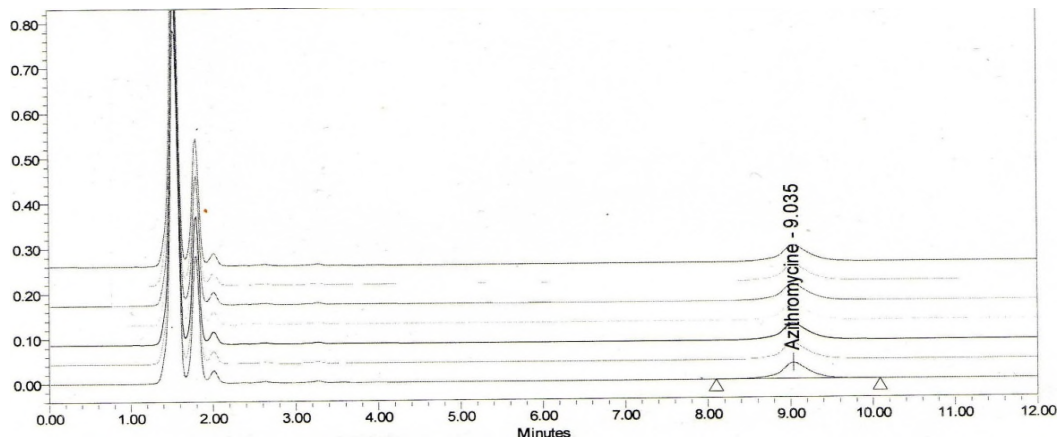
1<sup>ère</sup> jour :



2<sup>ème</sup> jour :

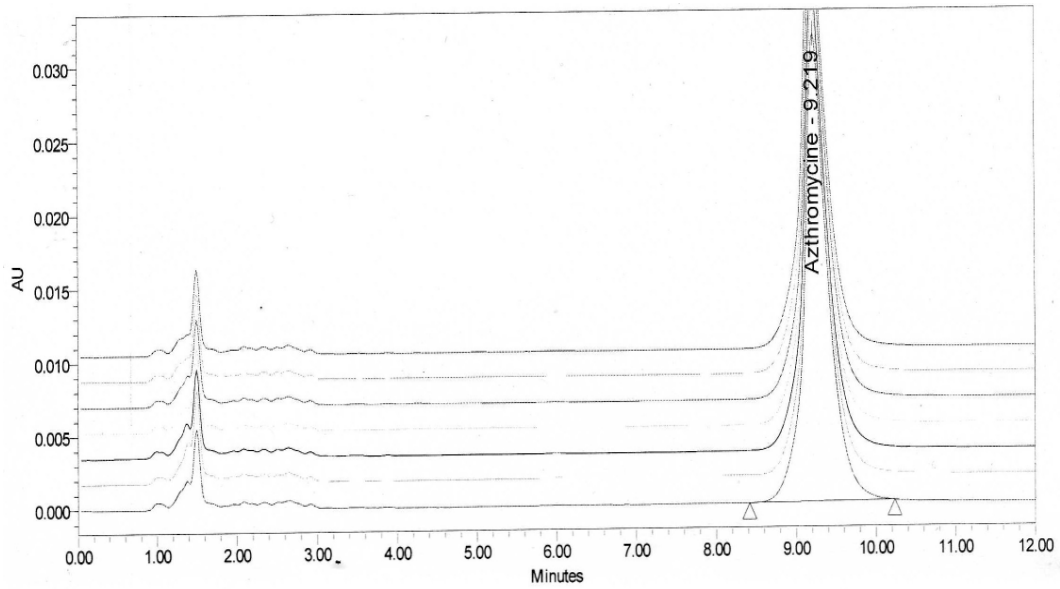


3<sup>ème</sup> jour :

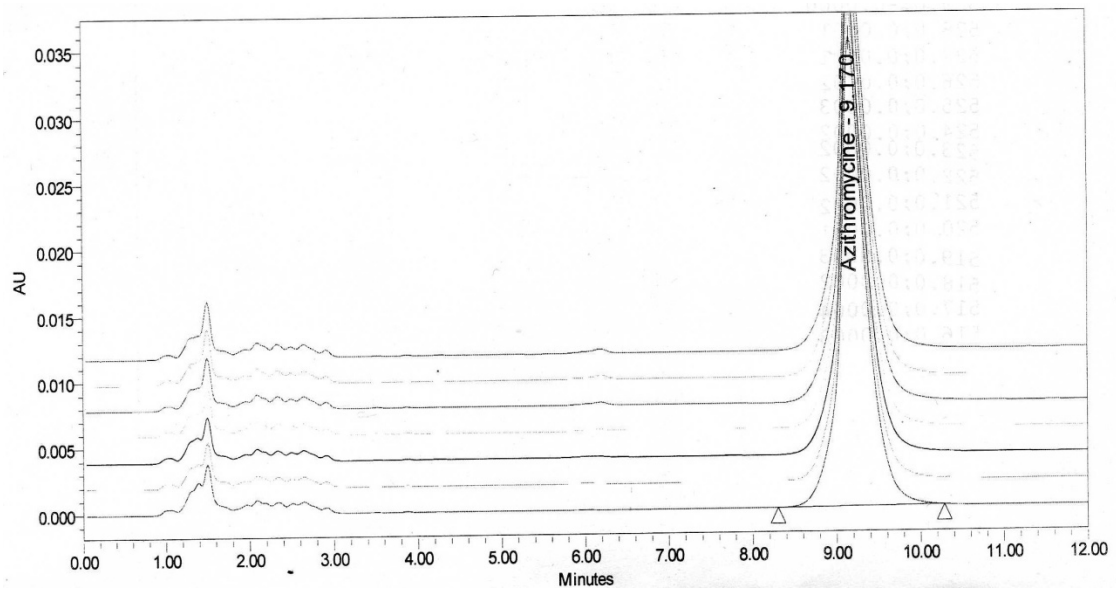


Les chromatogrammes du critère d'exactitude par rapport au standard.

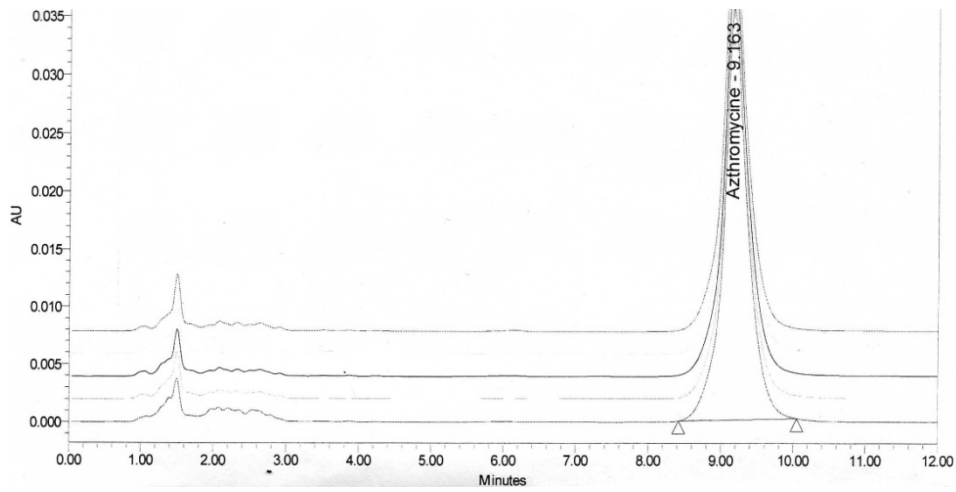
Chromatogramme du critère d'exactitude de Standard à 80 % :



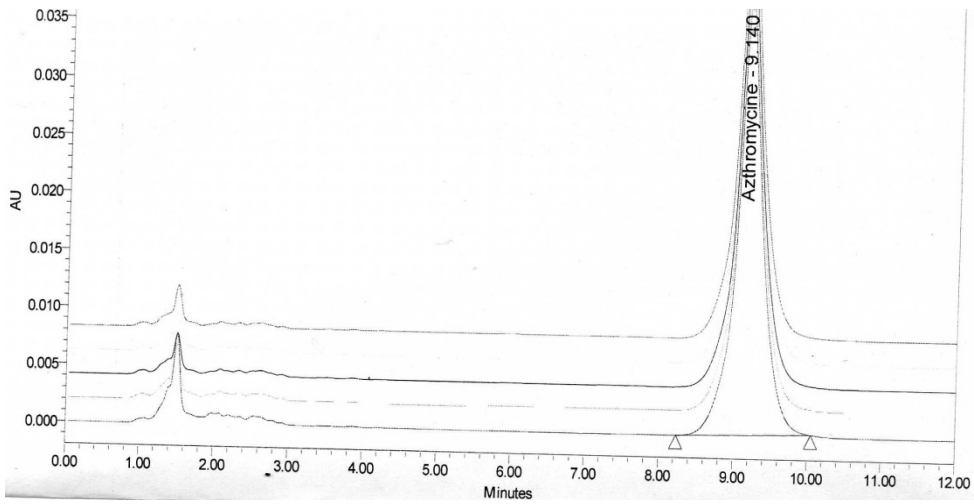
Chromatogramme du critère d'exactitude de Standard à 90 %



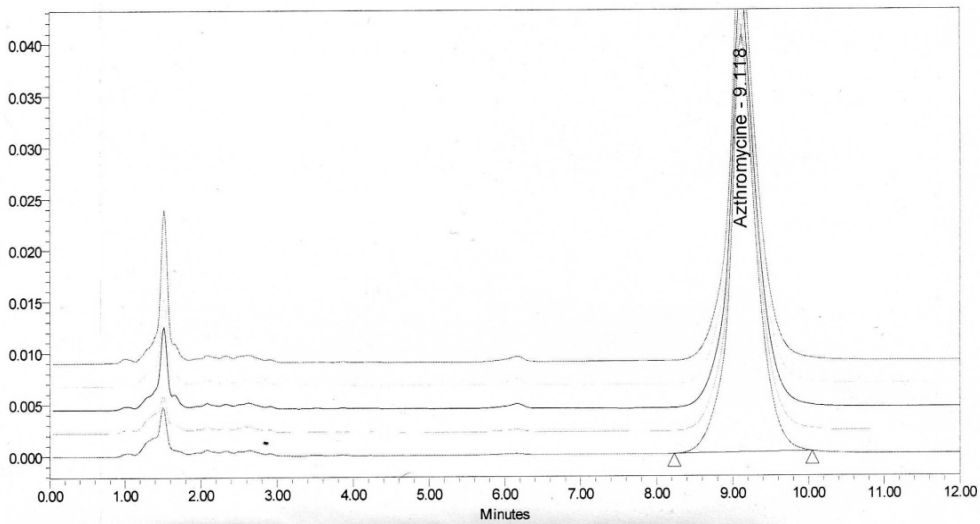
Chromatogramme du critère d'exactitude de Standard à 100 % :



Chromatogramme du critère d'exactitude de Standard à 110 % :

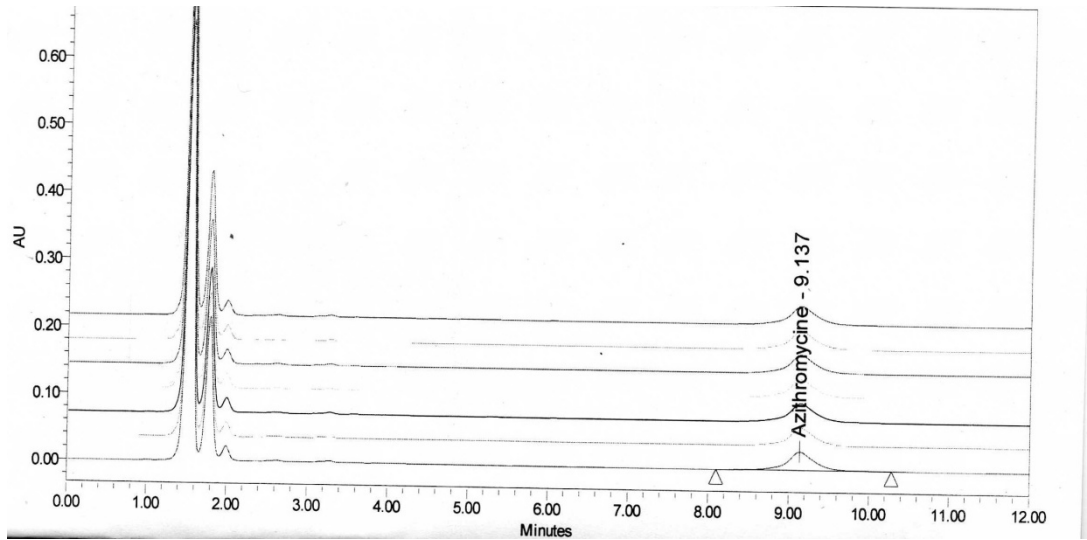


Chromatogramme du critère d'exactitude de Standard à 120 % :

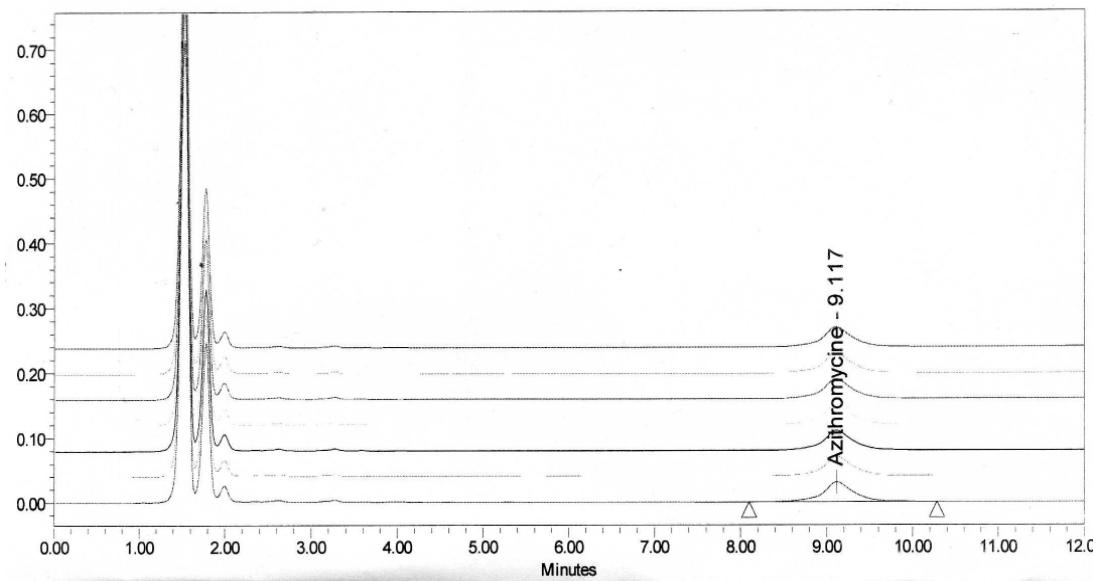


**Les chromatogrammes du critère d'exactitude par rapport au standard.**

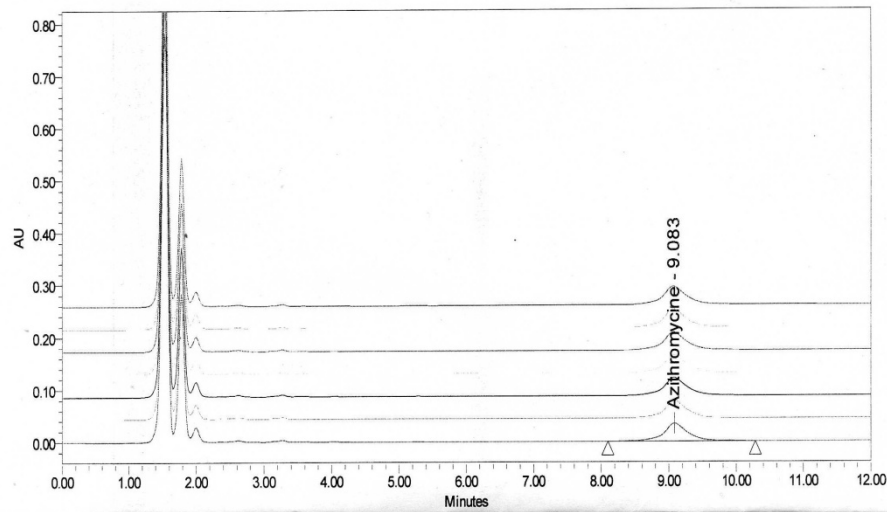
Chromatogramme du critère d'exactitude de Produit fini à dilution 80 % :



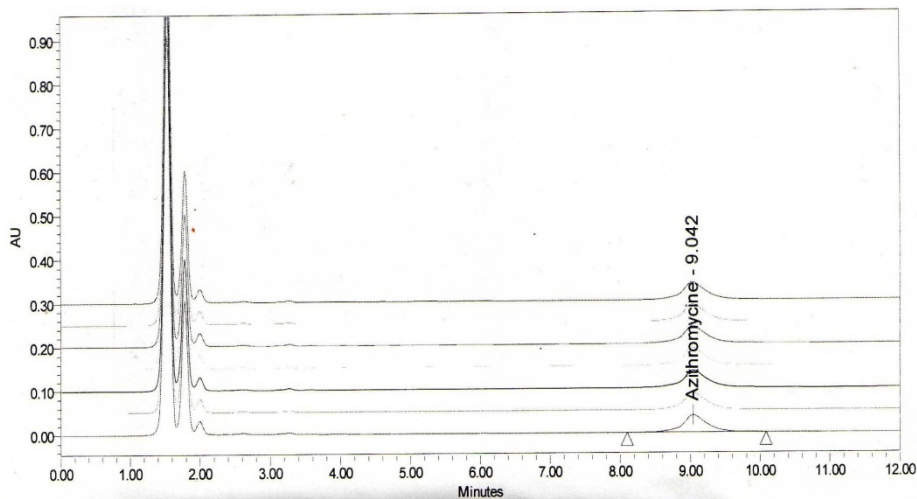
Chromatogramme du critère d'exactitude de produit fini à 90 % :



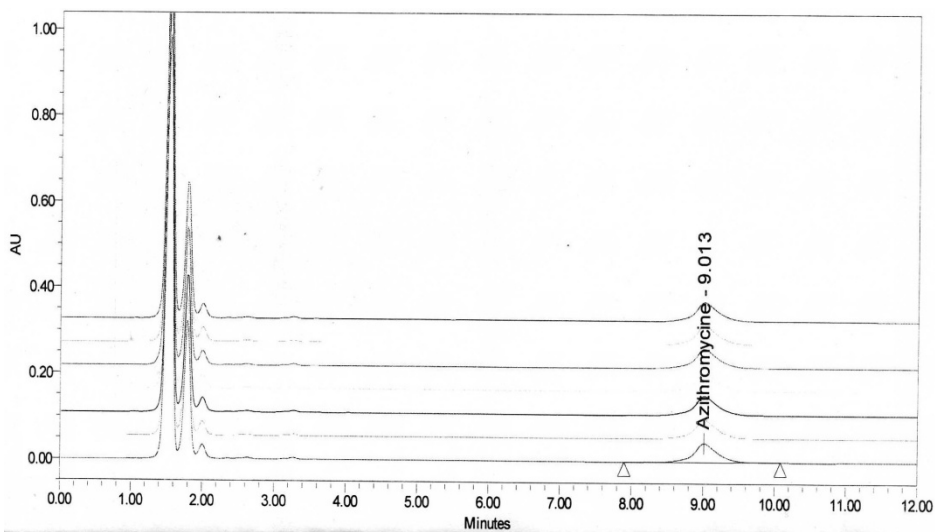
Chromatogramme du critère d'exactitude de produit fini à 100 % :



Chromatogramme du critère d'exactitude de produit fini à 110 % :

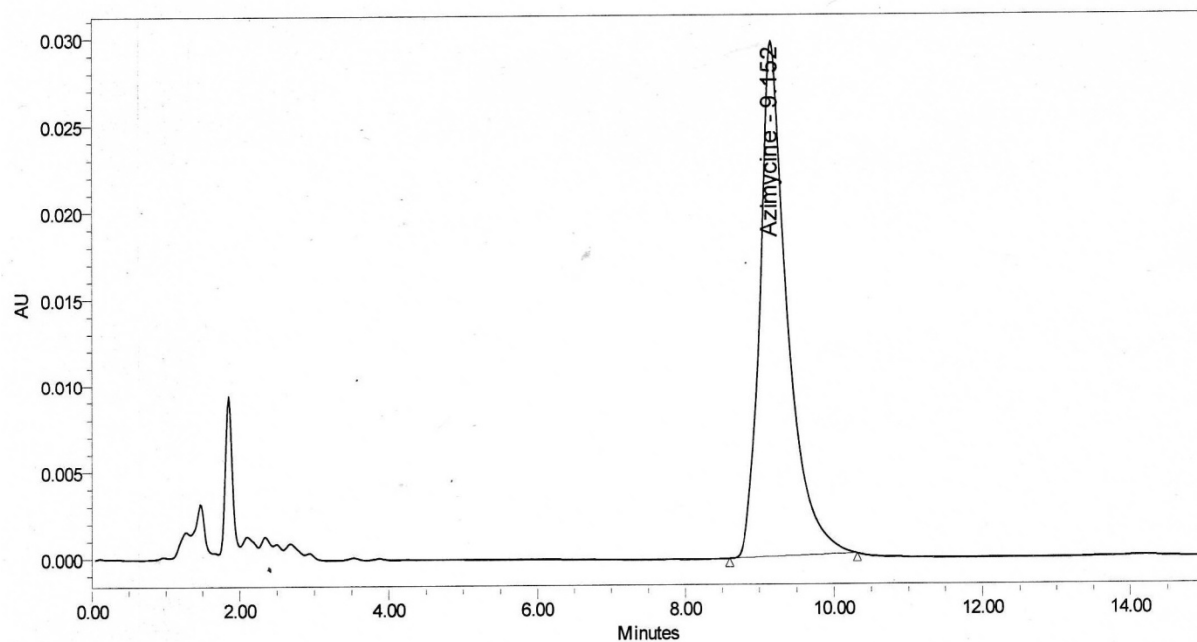


Chromatogramme du critère d'exactitude de produit fini à 120 % :



**Les chromatogrammes du critère de limite de détection et limite de quantification par rapport au standard à dilution:**

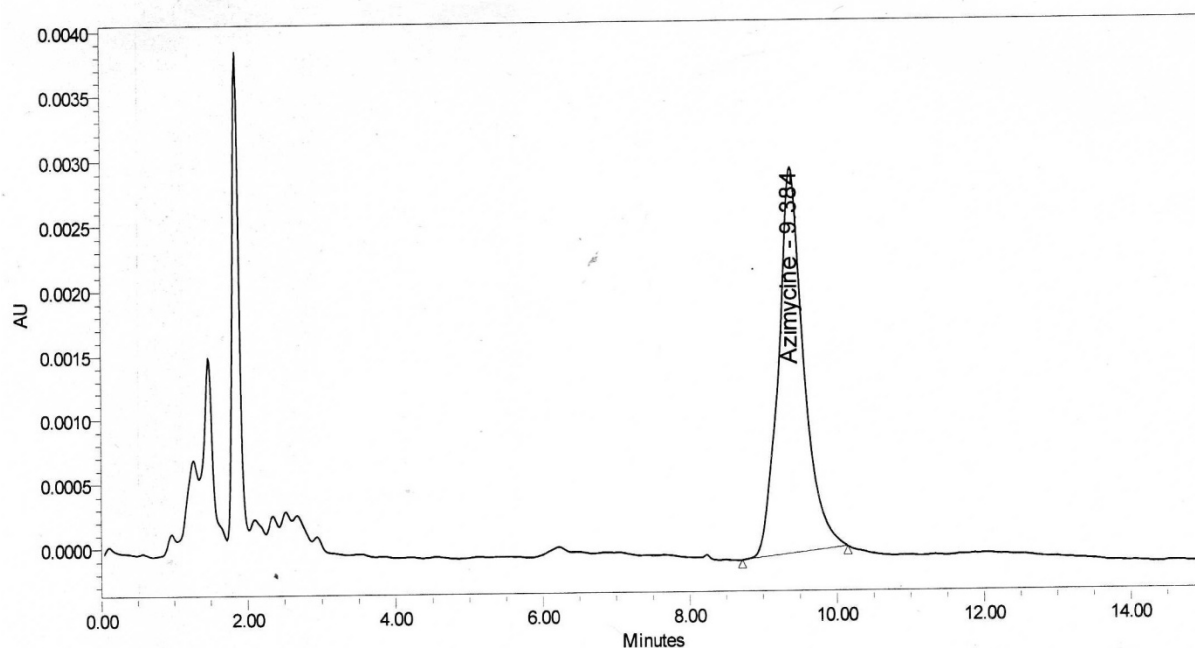
Chromatogramme du Standard de concentration 1 mg / ml :



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Azimycine	9.152	758039	100.00	29778

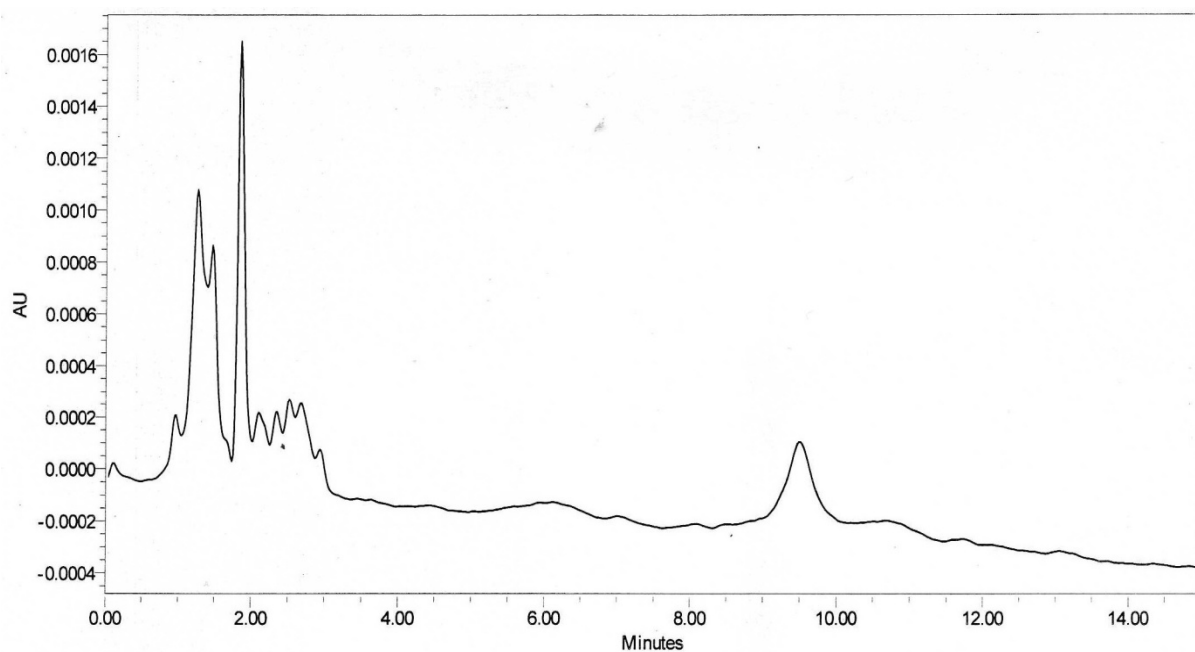


Chromatogramme du Standard de concentration  $10^{-1}$  mg/ml :



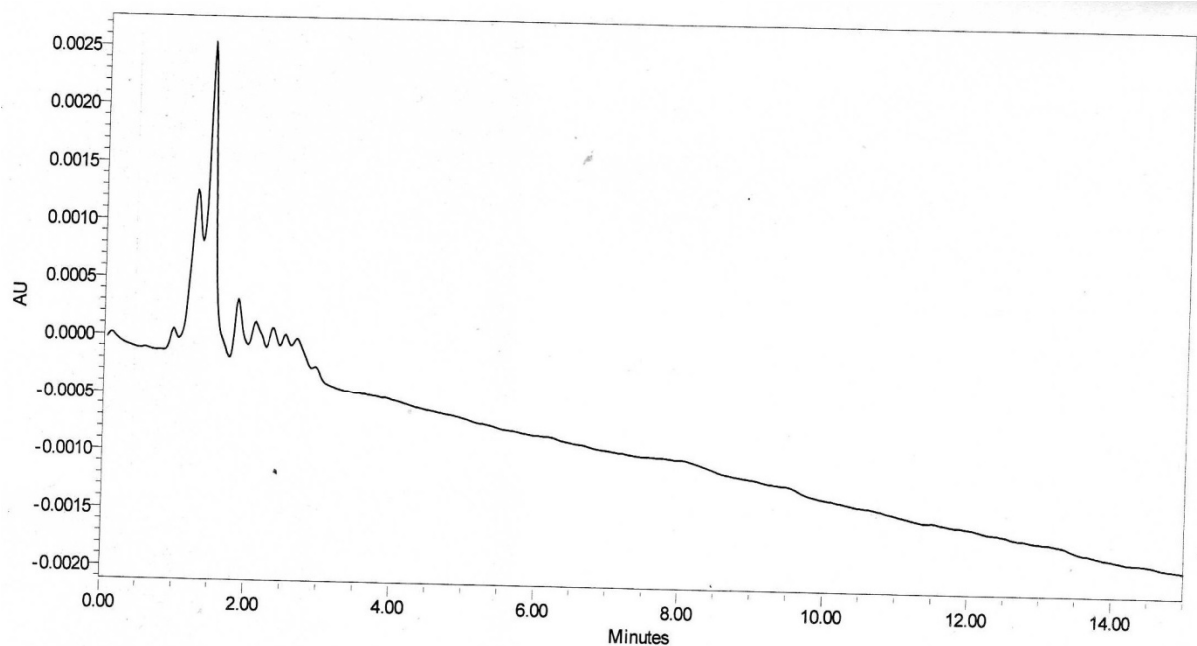
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Azimycine	9.384	70941	100.00	2990

Chromatogramme du Standard de concentration  $10^{-2}$  mg/ml :



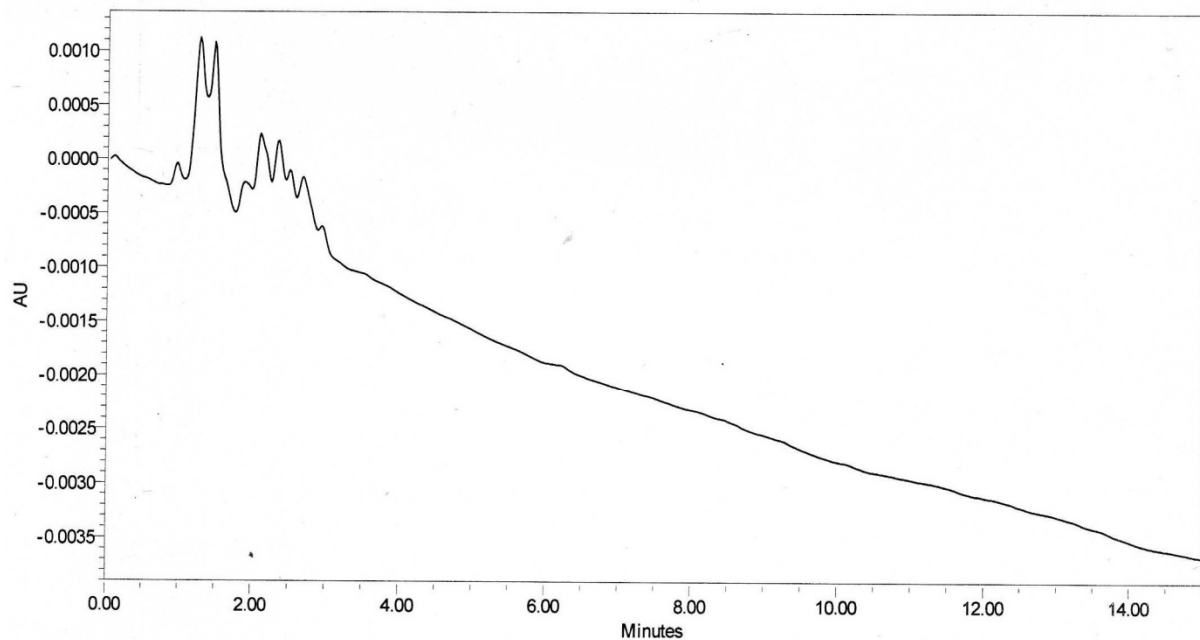
	Peak Name	RT
1	Azimycine	9.384

Chromatogramme du Standard de concentration  $10^{-3}$  mg/ml:



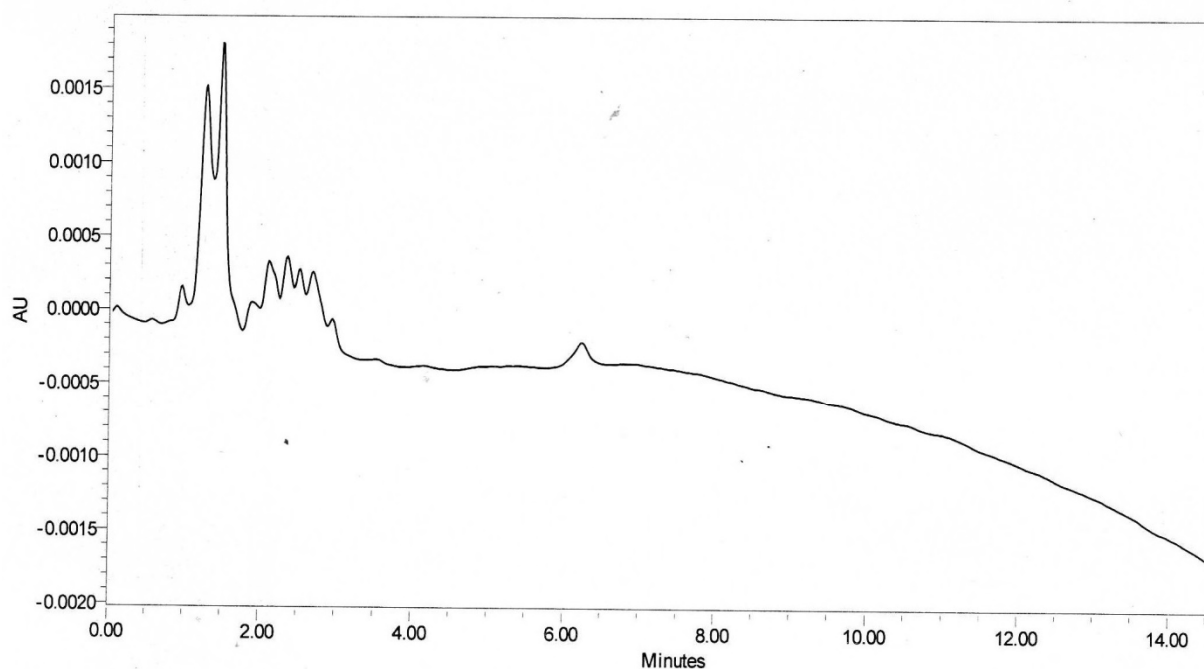
	Peak Name	RT
1	Azimycine	9.384

Chromatogramme du Standard de concentration  $10^{-4}$  mg/ml:



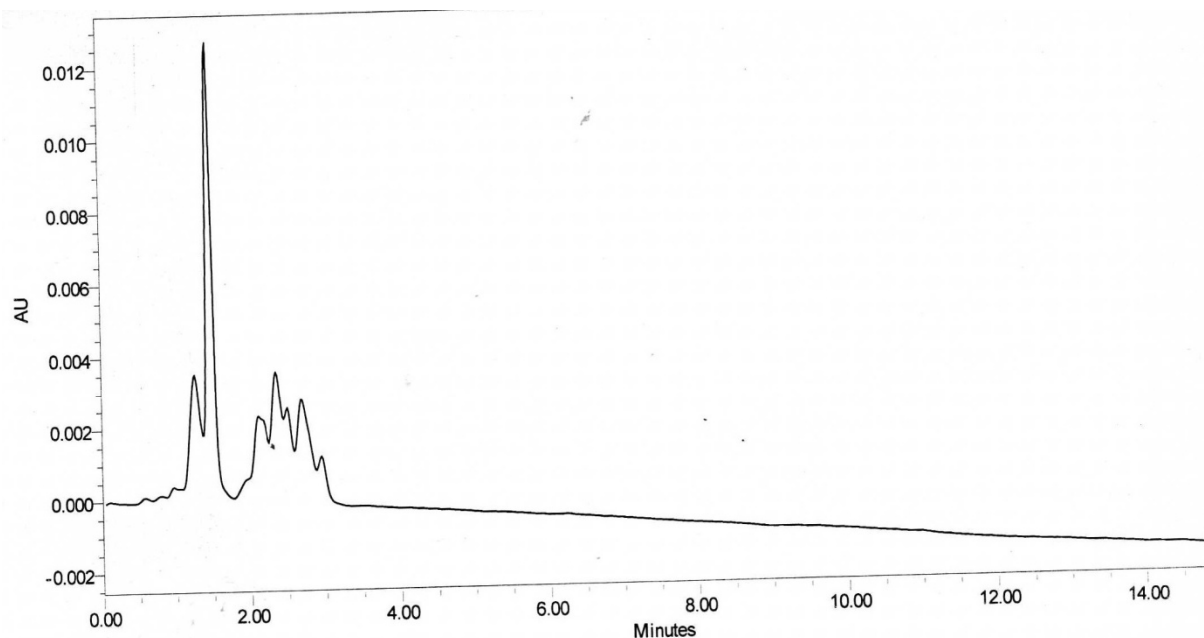
	Peak Name	RT
1	Azimycine	9.384

Chromatogramme du Standard de concentration  $10^{-5}$  mg/ ml:



	Peak Name	RT
1	Azimycine	9.384

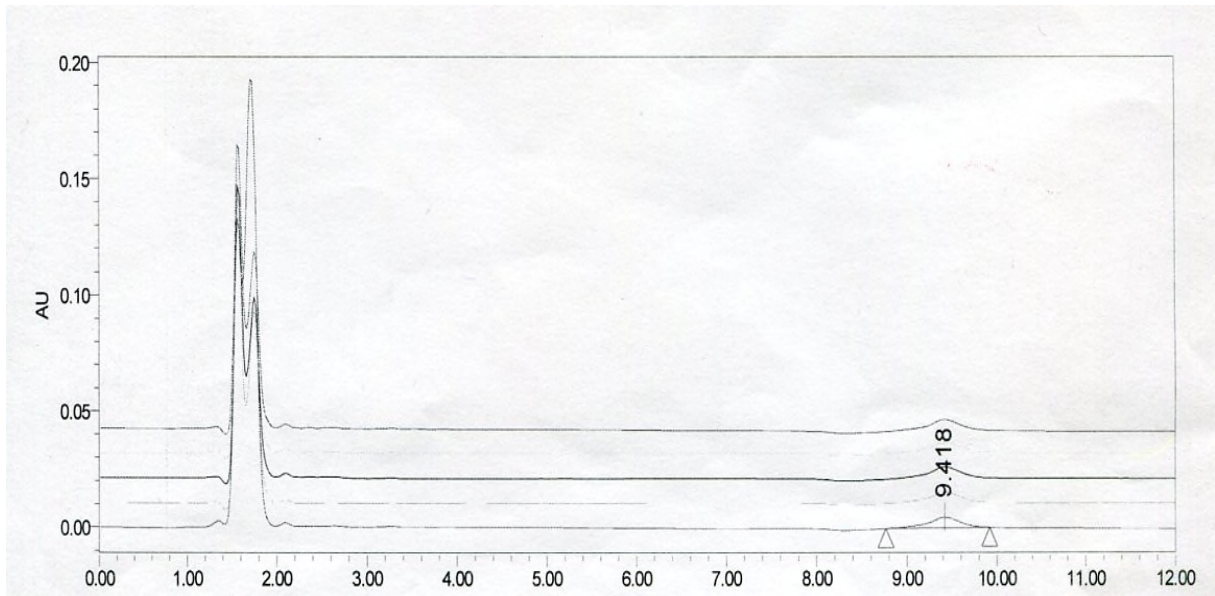
Chromatogramme du Standard de concentration  $10^{-6}$  mg/ ml:



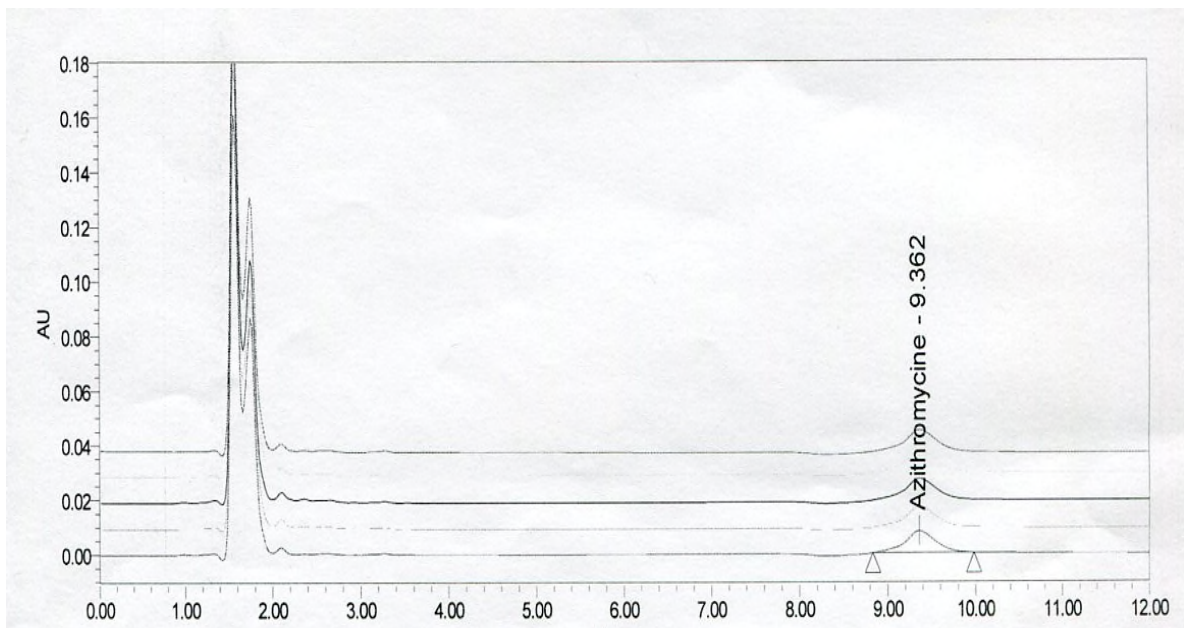
	Peak Name	RT
1	Azimycine	9.384

Chromatogramme de validation biopharmaceutique de produit fini Azimycine® :

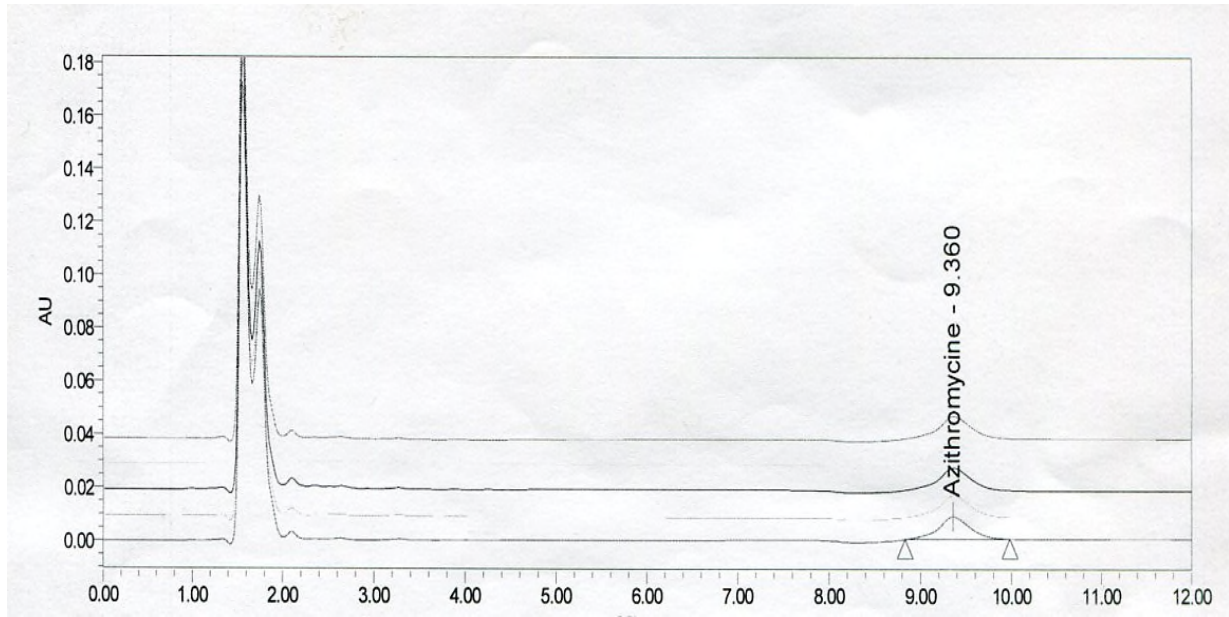
Dissolution de produit fini à 5 min :



Dissolution de produit fini à 15 min :



Dissolution de produit fini à 30 min :



Dissolution de produit fini à 45 min :

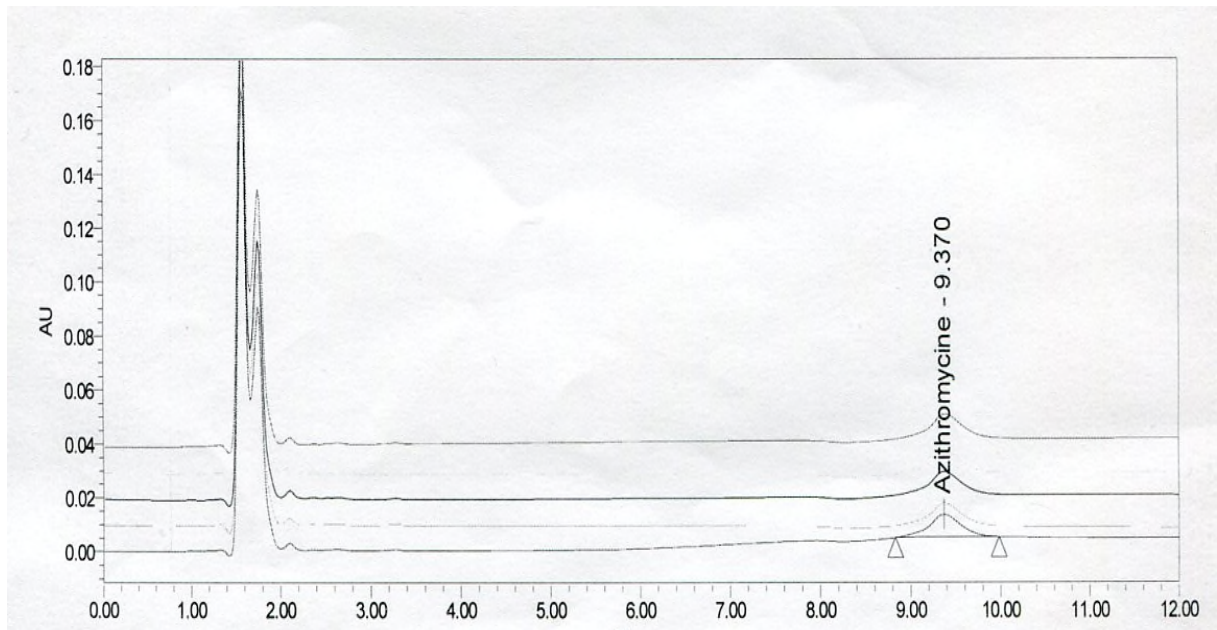
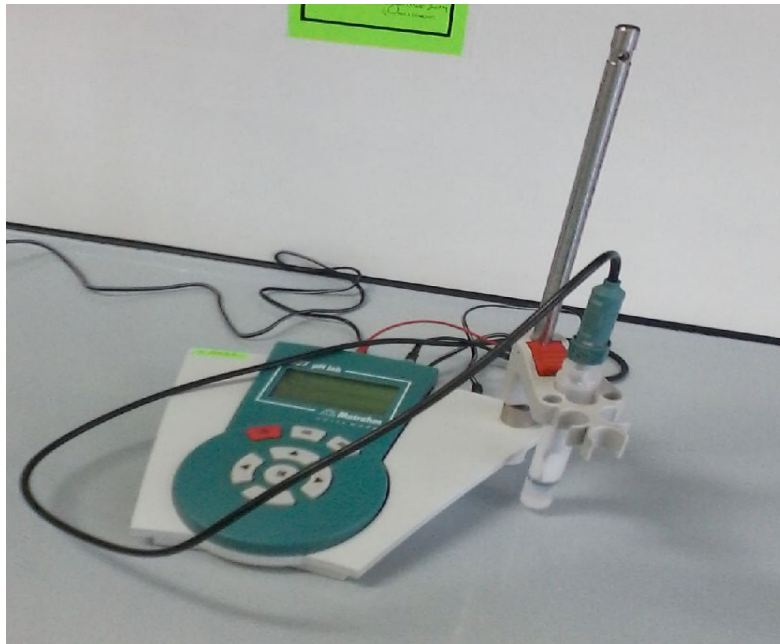




Figure 1 : Appareil de l'HPLC pour l'injection automatique



Figure 2 : Appareil de l'HPLC pour l'injection manuel



**Figure 3 :** Appareil d'un pH mètre



**Figure 4 :** Appareil d'un agitateur magnétique



**Figure 5 :** Appareil d'une balance électronique.



**Figure 6 :** Appareil d'un bain ultrason

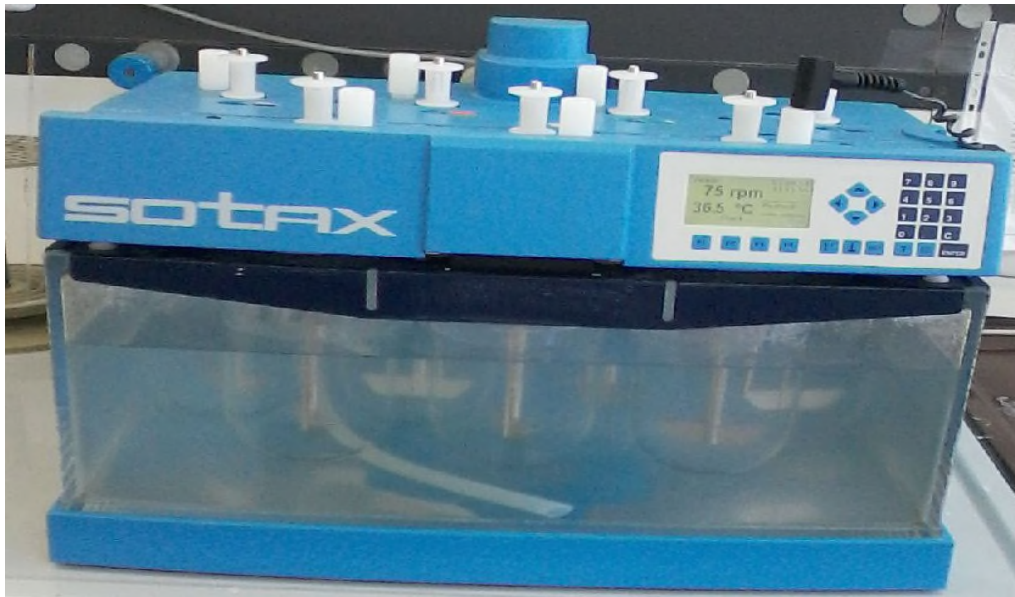




Figure 7 : Appareil de filtration avec un filtre de 45 µm



Figure 8: Appareil d'une centrifugeuse



**Figure 9:** Appareil de dissolution à palette

## Résumé

Le domaine de la santé publique est un domaine particulièrement compliqué et délicat. Il se présente comme un système composé de plusieurs volets interactifs. Le médicament constitue à ce titre le volet le plus appréciable.

Le dosage analytique d'un certain nombre de médicaments exige comme pour la détermination des paramètres chimiques et biochimiques, une validation des méthodes du dosage mises en œuvre et la qualification des équipements utilisés à cet effet.

La validation analytique de la méthode de dosage par HPLC, concerne la vérification des paramètres: Spécificité, linéarité, précision, l'exactitude et limite de détection et de quantification et la validation biopharmaceutique du produit fini permet la vérification du : Test de dissolution.

La méthode de dosage par HPLC est fiable, puisque elle a été validée par les trois tests statistiques de Student, Fisher et Cochran et par conséquent peut être appliquée dans les analyses de routine du produit fini pour la libération des lots fabriqués et les résultats obtenus de la dissolution de l'Azimycine sont conforme à la norme décret par l'USP 25<sup>e</sup> édition qui exige un taux de libération supérieur à 80% au bout de 45 min.

## Abstract

The field of public health is a particularly complex and sensitive area. It presents itself as a system composed of several interacting components. The drug thus constitutes the most significant component.

The analytical determination of a number of drugs as required for the determination of chemical and biochemical parameters, a validation of the assay methods implemented and qualification of equipment used for this purpose.

The analytical method validation of HPLC assay, for verification parameters: Specificity, linearity, precision, accuracy and limits of detection and quantification and validation of biopharmaceutical finished product allows verification: Dissolution Test.

The HPLC assay is reliable, because it has been validated by the three statistical tests Student, Fisher and Cochran and therefore can be applied in routine analysis of the finished for the release of batches manufactured product and the results of dissolving the Azimycine are compliant with the decree USP 25th requiring a release rate greater than 80% after 45 min.

**Mots clés:** Antibiotiques, Azithromycine, Azimycine, validation analytique, validation biopharmaceutique, dosage, HPLC, critères de validation, test de dissolution.