

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
DE TIZI OUZOU

Département de Pharmacie



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

†.⊙∞∧∞.⊥ξ† ∫∞∞∞∞ ∫ ∫∞∞∞∞∞∞∞

N° D'ORDRE :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de docteur en Pharmacie

Présenté et soutenu publiquement

Le 18 JUILLET 2024

Thème

**Mise au point et validation d'une méthode de dosage simultané de
l'Amoxicilline et l'Acide clavulanique dans des comprimés
d'AUGMENTIN® 500/62.5 mg par HPLC-UV Visible :
Selon le protocole établie par Société Française des Sciences
Techniques et Pharmaceutique (SFSTP) 2006**

Réalisé par :

MEZALA DJAZIA

BICHARI OUSSAMA IMAD EDDINE

Membres du jury :

Dr. BEN SI SAID Hassan	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	President de jury
Pr. MAMOU Marzouk	Professeur	Faculté de Médecine	UMMTO	Promoteur
Dr CHEKROUN Tassadit	Résidente	Faculté de Médecine	UMMTO	Co-Promotrice
Dr. BELAICH Anfal	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2023/2024

Résumé :

De nos jours, Les antibiotiques, comme l'Augmentin, ont un rôle essentiel dans le traitement des infections bactériennes, en ce qui concerne la lutte efficace contre les agents pathogènes et la préservation de la santé publique.

Le contrôle qualité de ce produit pharmaceutique constitue une exigence réglementaire à laquelle tous les laboratoires pharmaceutiques doivent satisfaire. Pour ce faire, ils utilisent des méthodes analytiques qui requièrent une validation afin d'assurer la conformité aux normes réglementaires, garantir la sécurité et l'efficacité du produit, et maintenir la confiance du patient et des professionnels de la santé en fournissant des médicaments de qualité supérieure.

L'objectif de cette étude consiste à développer une méthode fiable et efficace pour doser simultanément l'amoxicilline et l'acide clavulanique ; les deux principes actifs de l'Augmentin.

Une méthode simple, rapide et précise pour la détermination simultanée d'amoxicilline et d'acide clavulanique à l'aide de HPLC à détection UV-Visible avec la phase stationnaire de Gel de silice a été développée, elle implique l'utilisation de la solution tampon de (dihydrogène phosphate de sodium) NaH_2PO_4 et d'acetonitrile (97:3) comme phase mobile, détection à 225 nm et chromatogramme dans les 8 minutes.

La phase mobile et les conditions chromatographiques de l'appareil HPLC ont été optimisées pour obtenir une séparation optimale des deux composés.

Cette méthode a été validée au niveau de laboratoire de Chimie Analytique de Département de Pharmacie à la Faculté de Médecine de TIZI-OUZOU, en termes de spécificité, linéarité, fidélité, exactitude, robustesse et stabilité des solutions en suivant le protocole de la validation établi par la commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP), et qui repose sur le profil d'exactitude comme outil de précision selon l'approche publiée dans la revue STP Pharma en janvier 2006 .

Mots clés : Amoxicilline, Acide clavulanique, comprimés, validations analytique, profil d'exactitude, HPLC

Abstract:

Nowadays, antibiotics, such as Augmentin, play an essential role in the treatment of bacterial infections, in terms of effective combating pathogens and preserving public health.

The quality control of this pharmaceutical product is a regulatory requirement that all pharmaceuticals must meet. To do this, they use analytical methods that require validation to ensure compliance with regulatory standards, guarantee product safety and effectiveness, and maintain the confidence of patients and health professionals by providing high-quality medicines.

The aim of this study is to develop a reliable and effective method for simultaneous dosing of amoxicillin and clavulanic acid; the two active ingredients of Augmentin.

A simple, fast and accurate method for the simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid using HPLC with UV detection-Visible with the stationary phase of silica gel has been developed, it involves the use of the buffer solution of (sodium dihydrogen phosphate) NaH_2PO_4 (pH 4.48) and acetonitrile (96.5:3.5) as mobile phase, detection at 225 nm and chromatogram within 8 minutes.

The mobile phase and chromatographic conditions of the HPLC device have been optimized to optimal separation of the two compounds.

This method has been validated at the laboratory level of Analytical Chemistry of the Department of Pharmacy at the Faculty of Medicine of TIZI-OUZOU, in terms of specificity, linearity, fidelity, accuracy, robustness and stability of the solutions following the validation protocol established by the committee of the French Society of Technical and Pharmaceutical Sciences (SFSTP), and which is based on the precision profile as a tool of precision according to the approach published in the journal STP Pharma in January 2006.

Keywords: Amoxicillin, Clavulanic acid, tablets, analytical validations, accuracy profile, HPLC.

I. Introduction

AUGMENTIN® est une association d'amoxicilline trihydratée, un antibiotique de la classe des β -lactamines, et de clavulanate de potassium, un inhibiteur puissant des β -lactamases (pénicillinases). Pour la première fois, il a été commercialisé aux États-Unis en 1980 par Beecham, plus connu sous le nom de GalaksoSmithKlain (GSK) (1,2).

L'amoxicilline/acide clavulanique est un médicament antibiotique à large spectre qui traite une grande variété d'infections bactériennes, telles que les infections des voies respiratoires supérieures et inférieures, ainsi que les infections cutanées et des tissus mous. Les différentes formes pharmaceutiques de cet antibiotique contiennent des ratios variés d'amoxicilline trihydrate et de clavulanate de potassium. Parmi celles-ci, nous examinerons AUGMENTIN® comprimés pelliculés 500/62,5 mg à libération immédiate (1,3).

Les deux principes actifs de cette formulation ont une absorption rapide par voie orale et sont classés selon le système de classification biopharmaceutique (BCS) en Classe I (4,5). Ils se distinguent par leur forte solubilité et leur forte perméabilité. Il est donc essentiel de mener des études sur la dissolution de ce médicament afin d'assurer son efficacité thérapeutique et d'évaluer sa biodisponibilité dans l'organisme (5).

Différentes techniques peuvent être utilisées pour déterminer simultanément les combinaisons AMX et CLA, telles que la spectrophotométrie UV-Visible, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détection ampérométrique, et la chimiluminescence. Selon la Pharmacopée américaine (USP) et la British Pharmacopoeia (BP) (7), l'HPLC est la méthode de référence pour évaluer les combinaisons AMX et CLA dans diverses formulations(6).

Néanmoins, il est primordial de procéder à une validation analytique afin d'assurer la fiabilité des résultats des différentes méthodes de dosage simultané de ces deux principes actifs, ainsi que d'évaluer de manière rigoureuse leur précision, leur exactitude et leur reproductibilité afin de garantir leur efficacité dans différentes conditions de laboratoire(7).

La validation analytique assure la cohérence et la fiabilité des résultats obtenus par les méthodes développées, ce qui est essentiel pour assurer la qualité et la conformité réglementaire des produits pharmaceutiques. Dans cette optique, plusieurs revues et documents réglementaires ont examiné et présenté en détails les principes de la validation, mettant en évidence son rôle essentiel dans le contrôle qualité et la certification des méthodes techniques (9).

Ces sources incluent les divers réglementations relatives aux bonnes pratiques (BPF, GMP ...), les monographies publiées par la Pharmacopée Européenne (EP) et la Pharmacopée Américaine (USP), et les documents réglementaires établies suites aux différentes normes comme : ISO, ICH, FDA, EMEA, et enfin SFSTP (10).

Notre recherche vise principalement à développer et à valider analytiquement une méthode qui nous permettra de doser simultanément les deux principes actifs : amoxicilline et acide clavulanique à l'aide de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) dans une nouvelle formulation en l'occurrence AUGMENTIN® comprimé pelliculé 500/62,5 mg, dans l'intérêt est l'étude de la cinétique de dissolution de cette dernière en se reposant sur le profil d'exactitude comme outil de précision en suivant le protocole de validation établi par la commission de la société française des sciences techniques et pharmaceutiques (SFSTP), publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

II. MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL

1.1. Appareillage

Le dispositif de dosage utilisé est un appareil HPLC de type **SHIMADZU LC20**, doté d'une pompe LC-20AT à double plongeur en série pour une distribution précise des solvants, d'un injecteur automatique SIL-20AC avec une capacité de chargement de 1 à 100 μL , d'un détecteur UV-VIS SPD 20A pour l'analyse quantitative et qualitative à longueur d'onde réglable entre 190 et 800 nm, d'un four à colonne CTO-20AC avec une plage de température variant de 4°C à 85°C, d'une colonne C18 (25cm), et enfin d'un logiciel de contrôle LabSolutions (10).

Autre matériel utilisé :

- Balance analytique type METTLER TOLEDO.
- Distillateur type Lab-Tech
- Pompe à vide type FISHER BIOBLOCK SCIENTIFIC
- Sonicateur type Advantage-Lab
- Agitateur magnétique type NAHITA mode 390-1
- pH-mètre type METTLER TOLEDO.

1.2. Verreries

- fioles de 2000 ml, 100 ml, et 50 ml.
- Eprouvette de 100 ml
- Bicher de 200 ml
- Pissette d'eau distillée
- Verre de montre et spatule
- Pipette graduée
- Compte-goutte

1.3. Réactifs

Les matières premières des deux principes actifs ainsi que les excipients de la solution placebo sont gracieusement offertes par les laboratoires GSK sis à Boudouaou.

- Amoxicilline trihydraté.
- Clavulanate de potassium.
- Les différents excipients utilisés dans la préparation du placebo.

Les solvants :

- Dihydrogène Phosphate de Sodium NaH_2PO_4
- Acetonitrile

2. METHODE

2.1. Choix du protocole de validation :

Le protocole de validation adopté dans notre étude est le **V2** sur lequel on a apporté des modifications, dont on a utilisé 5 niveaux de concentration au lieu de 3 niveaux pour les SE et les SV. La sélection du protocole de validation est faite en suivant les conditions décrites par la commission SFSTP qui sont :

- Procédure connue ultérieurement

- Absence de l'effet matrice
- Etalonnage a plusieurs points

Les niveaux de concentration utilisés pour le dosage une substance chimique (principe actif) dans le cadre d'une cinétique de dissolution d'une forme pharmaceutique sèche sont sélectionnés de manière à couvrir une plage de concentrations correspondant aux concentrations dissoutes du comprimé lors du test de dissolution à travers le temps, de la limite de quantification jusqu'à la concentration maximale. Dans le cadre d'une étude du profil de dissolution, des niveaux de concentration ont été choisis, représentant la plage des concentrations dissoutes d'un comprimé contenant 500 mg d'amoxicilline et 62,5 mg d'acide clavulanique, avec une Cmax de 100%, deux niveaux inférieurs à la Cmax de 60% à 80% et deux niveaux supérieurs à la Cmax de 120% à 140%.

2.2.Choix des paramètres de validation :

- **Limites d'acceptabilité (λ) :**

$\lambda = \pm 5\%$, signifie que pour une concentration de 500 mg/L d'amoxicilline le résultat sera compris au maximum entre 475 et 525 mg/L et que pour une concentration de 62.5 mg/L d'acide clavulanique le résultat sera compris entre 59.37 et 65.62 mg/L.

- **Probabilité de confiance (β) :**

$\beta = 95\%$, un niveau de confiance de 95% signifie que si l'on répétait l'expérience ou l'analyse un grand nombre de fois, 95% des intervalles de confiance calculés contiendraient la vraie valeur du paramètre estimé(11).

2.3.Optimisation des conditions expérimentales de la méthode de dosage :

Conformément aux informations fournies par les deux monographies de l'USP, amoxicilline et clavulanate de potassium en comprimé et de l'amoxicilline trihydraté, nous avons effectué plusieurs essais en apportant des modifications pour optimiser les conditions analytiques pour la méthode de dosage simultané de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique par HPLC UV-Visible. Les résultats de cette optimisation sont présentés dans le tableau I ci-dessous ;

Tableau I : Conditions chromatographiques optimisées pour la méthode de dosage simultané de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique

Colonne C18	Longueur	250 mm
	Diamètre	4.6 mm
	Taille des particules	5 μ m
Détection	Spectrométrie UV-Visible avec une longueur d'onde $\lambda=225$ nm	
Débit	1.2 ml/min	
Volume d'injection	20 μ L	
Température	Ambiante	
Temps d'analyse	8 min	
Phase mobile	NaH ₂ PO ₄ pH=4.48/ ACN avec une proportion de 96.5/3.5	
Mode d'élution	Isocratique	

2.4.Préparation des solutions :

- Phase mobile

Dans une fiole de 2000 ml, introduire une masse de 19,92 g du NaH_2PO_4 , dissoudre et compléter au trait de jauge avec l'eau. La phase mobile contient 96.5% du tampon suscité et 3.5% d'acétonitrile.

- Diluant

Le diluant contient 90% du tampon phosphate suscité et 10% d'acétonitrile.

- Standards d'Etalonnage (SE) :

- Préparation de la solution mère en acide clavulanique : selon le tableau II suivant :

Tableau II : Protocole de préparation de la solution mère d'acide clavulanique.

Niveau	60%	80%	100%	120%	140%
Masse en mg	45	60	75	90	105
Protocole	Dans des fioles de 50 ml : - Introduire la masse de l'acide clavulanique correspondante à chaque niveau de concentration. - Dissoudre et compléter au trait de jauge avec le diluant et agiter par retournement.				

La gamme des Standards d'Etalonnage ont été préparés selon le protocole décrit dans le tableau III ci-dessous

Tableau III : Méthode de préparation des Standards d'Etalonnage (SE).

Niveaux	60%	80%	100%	120%	140%					
Prise d'essai en mg d'amoxicilline	30	40	50	60	70					
Volume de la solution d'acide clavulanique	Dans une fiole de 100 ml on mesure : - La PE d'amoxicilline correspondante à chaque niveau de C - 10 ml de chaque solution mère d'acide clavulanique correspondant au même niveau de concentration.									
Répétitions	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Nombre de solutions	SE = 5*3*2 = 30 solutions (5 niveaux, 3 séries, 2 répétitions)									

- Solution Placebo (SP) :

Dans une fiole de 200 ml, peser une prise d'essai correspondant à une quantité du placebo suffisant pour 04 comprimés.

- dissoudre à l'aide des ultrasons dans un volume suffisant du diluant puis compléter au trait de jauge avec le diluant. Filtrer la solution à travers un papier filtre.

- Gamme des Standards de Validation (SV) :

Les Standards de Validation ont été préparés selon le protocole décrit dans le tableau IV.

Tableau IV : Préparation des Standards de Validation (SV).

Niveaux	60%	80%	100%	120%	140%										
Prise d'essai en mg d'amoxicilline	30	40	50	60	70										
Solution d'acide clavulanique	Dans une fiole de 100 ml ont mesure : - La PE d'amoxicilline correspondante a chaque niveau de C - 10 ml de chaque solution mère d'acide clavulanique correspondant au même niveau de concentration.														
Solution placebo	5 ml de la solution placébo														
Répétitions	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nombre de solution	SV = 5*3*3 = 45 solutions (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)														

2.5.Critères de validations :

La méthodologie suivie pour la validation analytique dans le présent travail est celle décrite dans le guide de la SFSTP 2006, basée sur le profil d'exactitude.

Les critères évalués sont :

- Spécificité-sélectivité.
- Fonction de réponse.
- Fidélité.
- Exactitude et profil d'exactitude.
- Linéarité.

A ceux-ci, sont ajoutés la robustesse et la stabilité des solutions.

2.6.Etude statistique

2.6.1. Spécificité-sélectivité :

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

L'étude de la spécificité nécessite la préparation et l'analyse des solutions suivantes :

- Le diluant ;
- Une solution placebo ;
- Une solution standard à 100% (par rapport à la concentration théorique) ;
- Une solution échantillon (ou forme reconstituée ou placebo chargé) à 100% (par rapport à la concentration théorique).

La spécificité est démontrée en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des quatre solutions précédemment préparées : les chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard 100% et l'échantillon 100% doivent renfermer des pics au même temps de rétention et avec des surfaces comparables et les chromatogrammes obtenus à partir du diluant et de la solution placebo ne doivent pas présenter un pic au même temps de rétention que l'amoxicilline et l'acide clavulanique.

2.6.2. Fonction de réponse :

Une fois les expériences réalisées et les données collectées, il convient tout d'abord de déterminer, sur la base des standards d'étalonnage (SE), la relation entre la réponse (signal ou

réponse de l'instrument) Y et la quantité (concentration) de l'analyte X . Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagé :

$$Y = f(X) + \varepsilon$$

Où ε est l'erreur associée à la fonction de réponse f appelée communément erreur résiduelle. Il faut donc ajuster la fonction de réponse, c'est à dire évaluer les paramètres du modèle, de manière à ce que l'erreur résiduelle soit minimisée.

Différentes fonctions de réponse sont envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré au tableau suivant.

Tableau V : Exemples de fonction de réponses.

Type	Equation	Paramètres	Linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	Pente β	Oui/Yes
Droite/Straight line	$Y = \alpha + \beta X$	Ordonnée à l'origine α Pente β	Oui/Yes

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non).

Des transformations mathématiques sont également envisageables. Par exemple, le logarithme népérien ou la racine carrée pourrait être appliqué à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y .

2.5.3 Prédiction inverses

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit :

Tableau VI : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonction de réponses.

Fonction de réponse	Concentration calculée
Droite passant par l'origine	$x_{ijk,cal} = \frac{y_{ijk}}{\beta}$
Droite	$x_{ijk,cal} = \frac{y_{ijk} - \alpha}{\beta}$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y_{ijk} par $y_{ijk,c}$ dans le tableau précédent.

Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse après ce calcul en retour.

2.5.4 Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des

concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit :

$$\begin{aligned} \mathbf{biais}_j &= \hat{\mu}_j - \bar{x}_j \\ \mathbf{biais}(\%)_j &= 100 \times \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \\ \mathbf{Recouvrement}(\%)_j &= 100 \times \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \end{aligned}$$

Où : μ_j : moyenne des concentrations calculées du niveau j \bar{x}_j : Moyenne des concentrations introduites du niveau j.

2.5.5 Fidélité :

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra- et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire :

$$\begin{aligned} \mathbf{Répétabilité} : \hat{\sigma}_{Re,j}^2 &= \hat{\sigma}_{W,j}^2 \\ \mathbf{Fidélité intermédiaire} : \hat{\sigma}_{IP,j}^2 &= \hat{\sigma}_{W,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2 \\ \mathbf{CV}_{\text{répétabilité}} &= 100 \hat{\sigma}_{W,j} / \bar{x}_{j,calc} \\ \mathbf{CV}_{\text{Fidélité intermédiaire}} &= 100 \hat{\sigma}_{IP,j} / \bar{x}_{j,calc} \end{aligned}$$

2.5.6 Exactitude :

L'exactitude d'un résultat exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure :

$$\mathbf{Exactitude} = X - \mu$$

Pour chaque modèle et chaque observation l'exactitude de la mesure en valeur relative, est donnée par :

$$\mathbf{Exactitude (\%)} = \frac{X - \mu}{\mu} \times 100$$

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre déjà l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats.

2.5.7 Erreur totale et profil d'erreur totale :

Chaque mesure obtenue est le reflet de la vraie valeur, du biais de la méthode et de sa fidélité, ce qui s'exprime comme suit :

$$\begin{aligned} x &= \mu + |\mathbf{biais}|_{\text{procédure}} + \mathbf{fidélité intermédiaire}_{\text{procédure}} \\ x - \mu &= |\mathbf{biais}|_{\text{procédure}} + \mathbf{fidélité intermédiaire}_{\text{procédure}} \\ x - \mu &= \mathbf{erreur totale}_{\text{procédure}} \end{aligned}$$

L'Erreur Totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Donc l'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode. Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité.

2.5.8 Profil d'exactitude et décision :

Calcul : Le profil d'exactitude s'obtient en reliant entre elles les bornes supérieures puis les bornes Inférieures de l'intervalle de tolérance :

$$L_j = \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1 + \beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{PnB_j^2} CV_{F,I,j}}$$
$$U_j = \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1 + \beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{PnB_j^2} CV_{F,I,j}}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$).

2.5.9 Choix de la fonction de réponse :

Parmi les fonctions de réponse testées, seules sont retenues celles dont les profils d'exactitude sont compris dans l'intervalle de tolérance. Outre ce critère de sélection, la fonction de réponse la plus simple est choisie (Exemple : fonction linéaire simple ou passant par zéro).

Il est à noter, qu'en plus de ces critères de choix, le modèle retenu doit donner une linéarité avec une droite ayant un coefficient de détermination satisfaisant ($R^2 \geq 0,99$ est souhaitable).

2.5.10 Linéarité :

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité en analyte dans l'échantillon. L'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentrations calculées = f (concentrations introduites)).

2.5.11 Limites de quantification :

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles des mesures attendues, permet donc, de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LLOQ) et haute (ULOQ) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie.

2.5.12 Robustesse :

Pour évaluer la robustesse d'une procédure d'analyse on utilise la technique des plans factoriels qui fait varier plusieurs paramètres en même temps. Ce procédé permet de diminuer de façon importante le nombre d'essais et l'étude des interactions entre paramètres, c'est-à-dire dépend de la modification simultanée de deux ou plusieurs paramètres. Le premier paramètre introduit sera toujours la teneur en substance à analyser, à cause de ses interactions possibles avec les autres paramètres. L'étude de reproductibilité permet d'orienter le choix des paramètres opératoires à étudier grâce aux écarts observés. L'étude de ces écarts précisera la valeur de l'écart admissible de ces paramètres à inclure dans les essais des plans factoriels.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

La méthode de dosage simultané de l'acide clavulanique et de l'amoxicilline dans le comprimé est validée selon le protocole SFSTP 2006 basé sur le profil d'exactitude. Le risque α est considéré à 5%, l'intervalle d'acceptabilité λ est pris de $\pm 5\%$ et le nombre $\beta = 95\%$.

1. Spécificité :

La spécificité de la méthode est démontrée par l'approche empirique.

La figure 1 ci-dessous donne les chromatogrammes obtenus à partir des solutions préparées et analysées : Diluant, placebo, standard et échantillon.

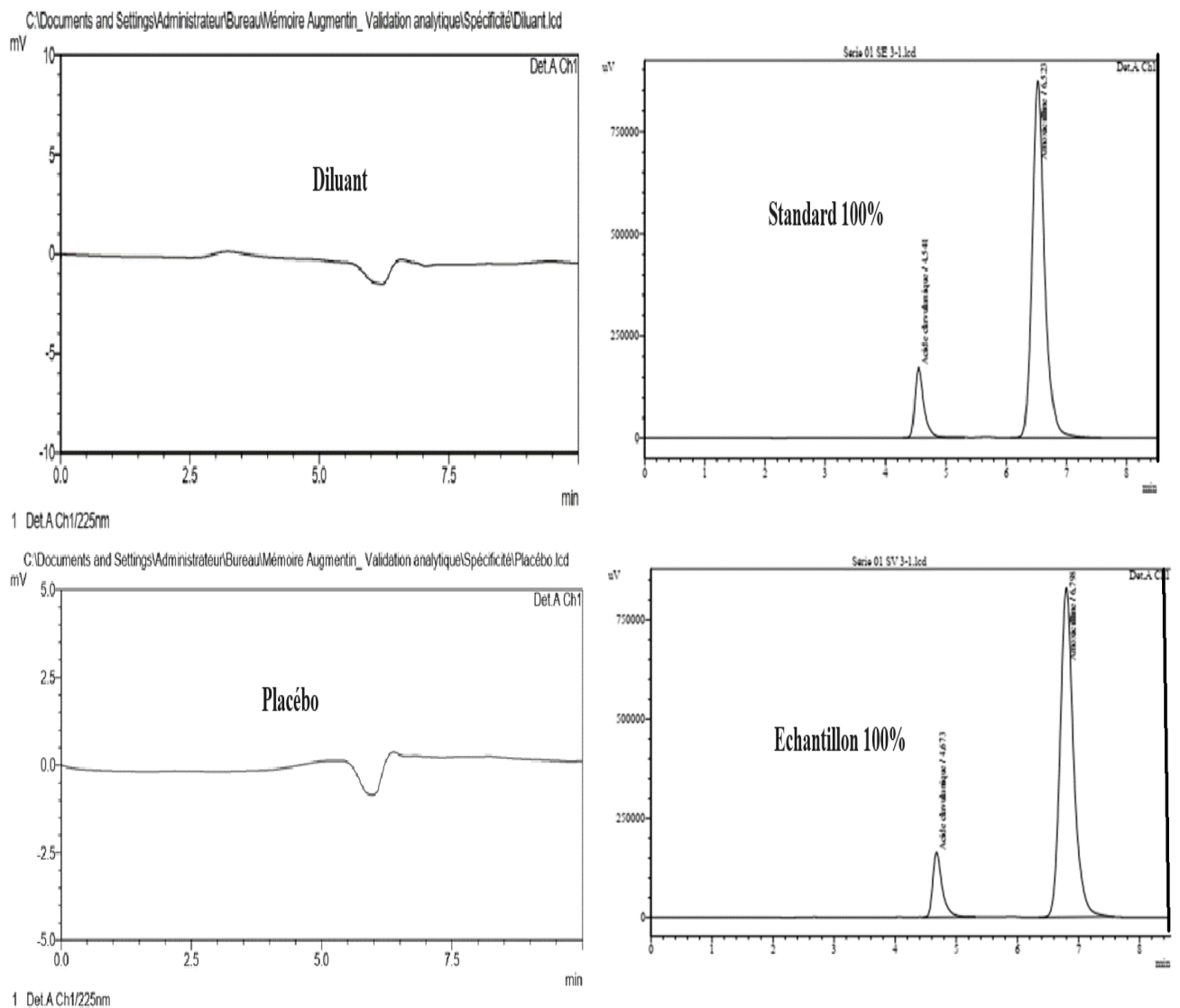


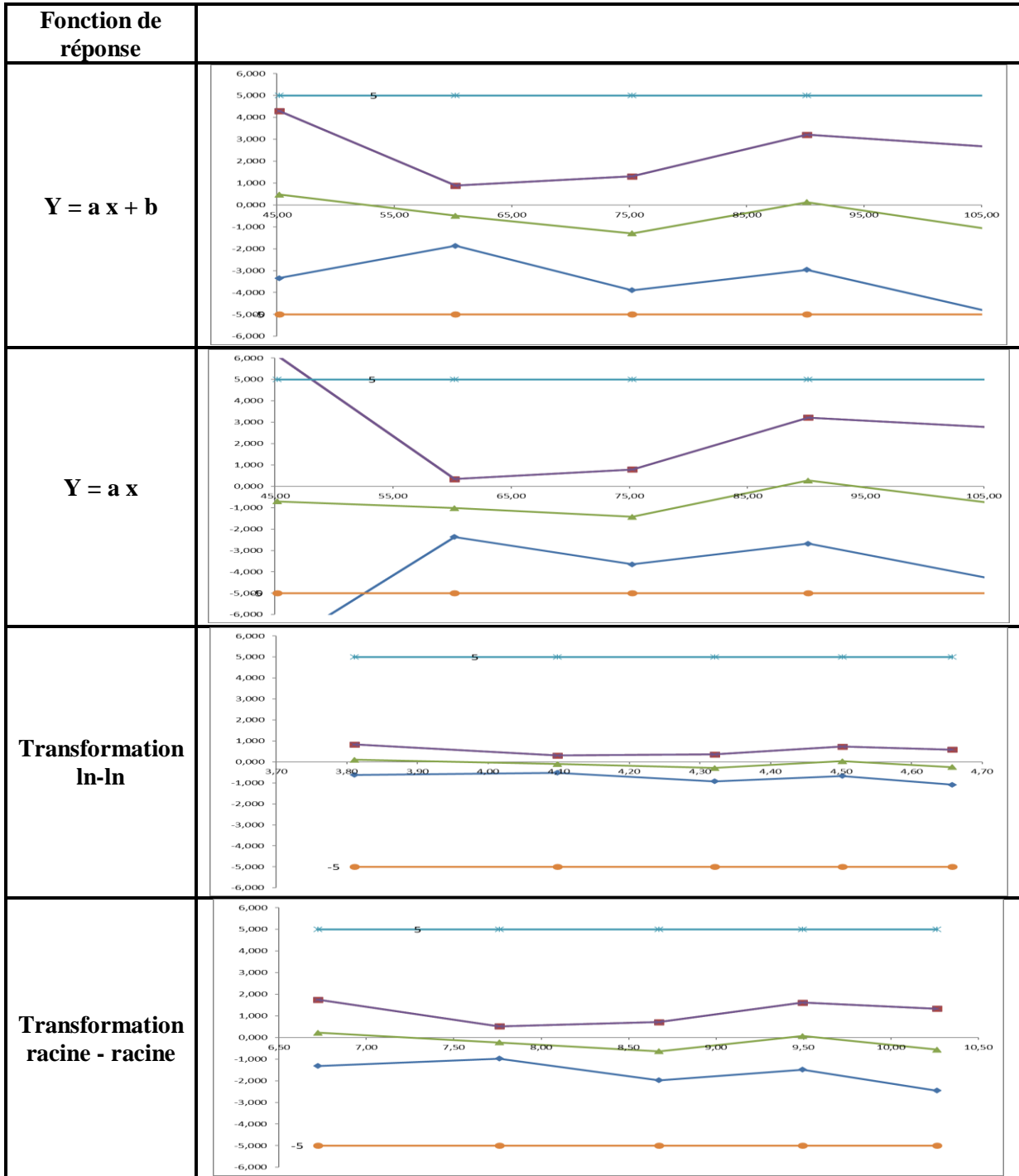
Fig 1 : Chromatogrammes obtenus pour l'étude de la spécificité

Discussion : sur les chromatogrammes obtenus à partir des blancs solvants, placebo, absence de pic au temps de rétention de l'acide clavulanique et de l'amoxicilline comparé au chromatogramme obtenu à partir de la solution standard à 100% et la solution échantillon à 100.

2. Fonction de réponse

Les profils d'exactitude obtenus pour les quatre fonctions de réponse testées, en l'occurrence, model linéaire simple $y=ax+b$, model linéaire passant par 0, transformation racine-racine et $\ln-\ln$ sont présentés dans les tableaux V et VI ci-après. Les figures 2 et 3 donnent les droites de régression linéaire au modèle de la fonction de réponse retenue.

Tableau V : Fonctions de réponse - acide clavulanique



Discussion

La fonction de réponse retenue est la fonction $y = a x + b$, le profil d'exactitude est compris dans l'intervalle d'acceptabilité, aussi en raison de sa simplicité d'application en analyse de routine.

Les droites de régression linéaires du dosage de l'acide clavulanique pour les trois séries sont présentées dans la figure 2 ci-dessous ;

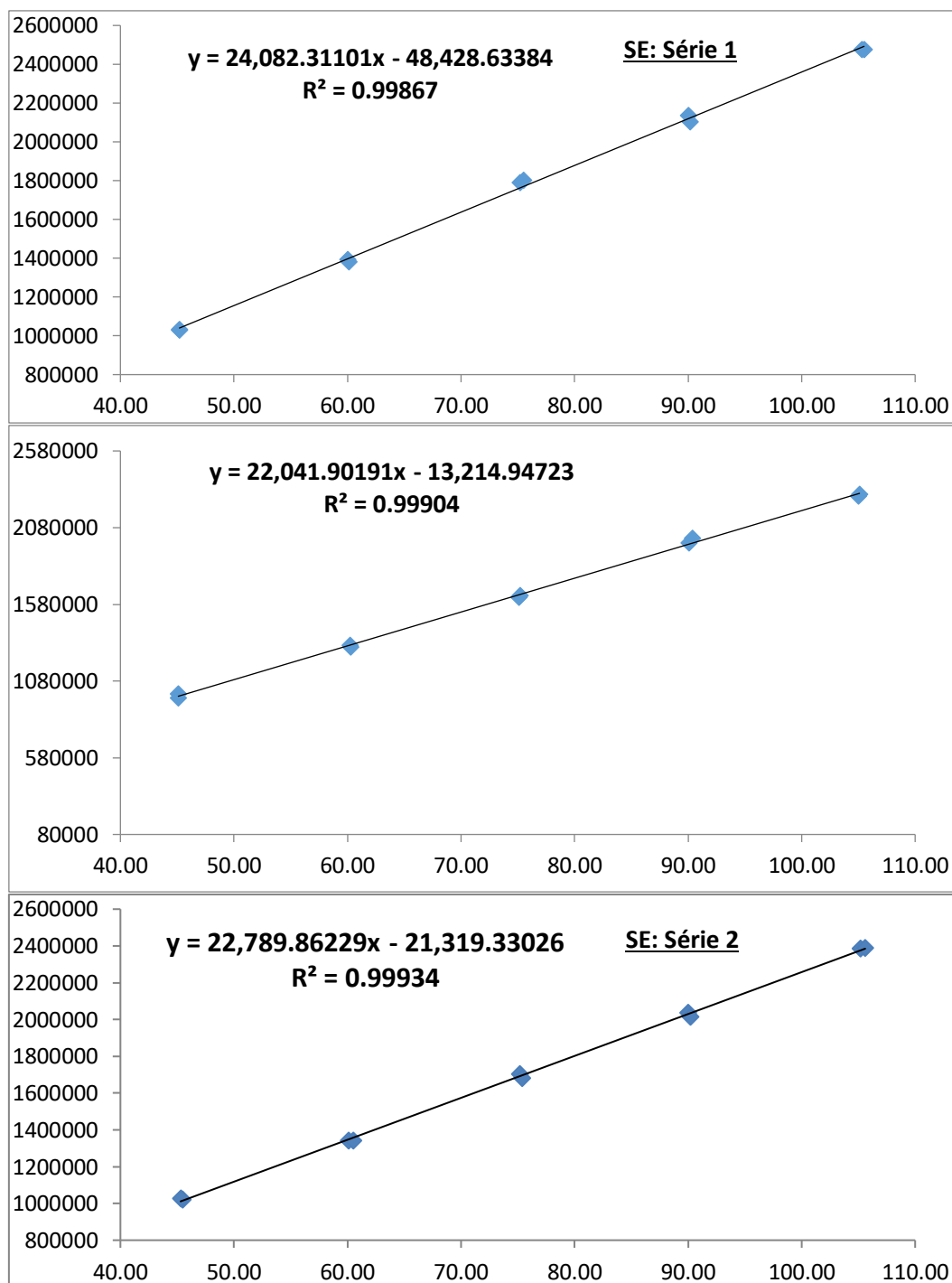
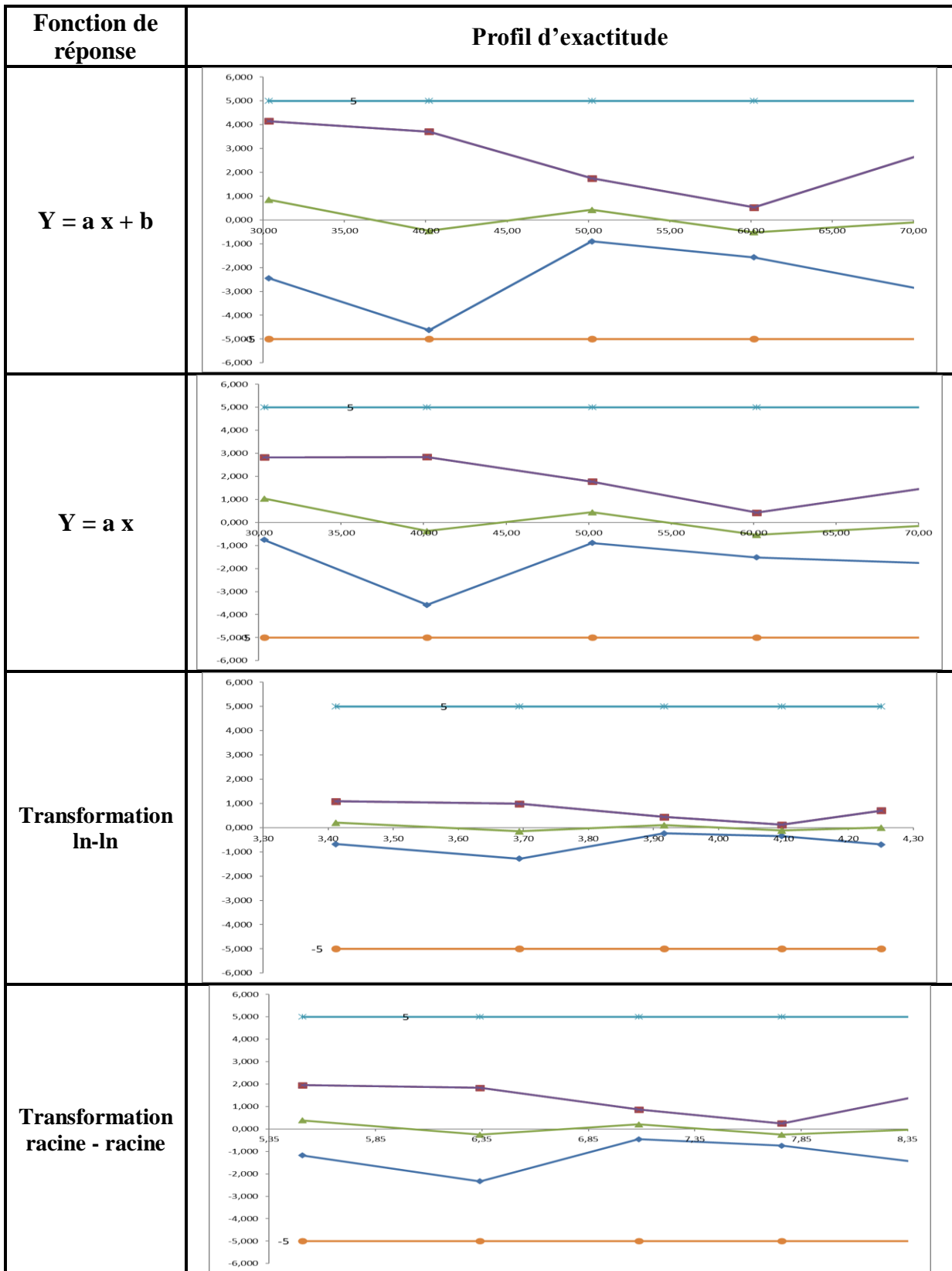


Fig 2 : Droite de régression linéaire – dosage de l'acide clavulanique

Tableau VI : Fonctions de réponse - amoxicilline



Discussion

La fonction de réponse retenue est la fonction $y = a x + b$, le profil d'exactitude est compris dans l'intervalle d'acceptabilité, aussi en raison de sa simplicité d'application en analyse de routine.

Les droites de régression linéaires du dosage de l'amoxicilline pour les trois séries sont présentées dans la figure 2 ci-dessous ;

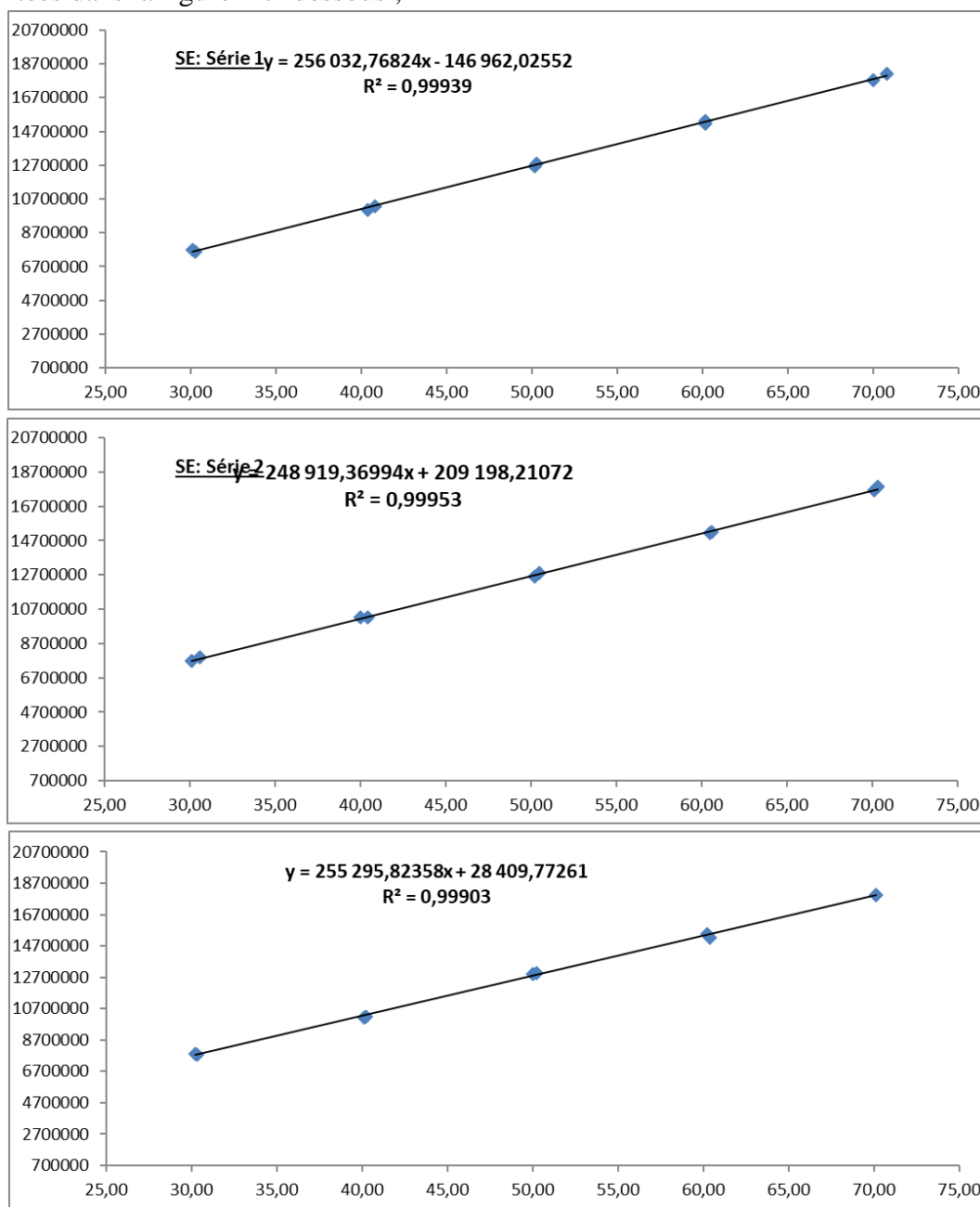


Fig 3 : Droite de régression linéaire – dosage de l'amoxicilline

3. Prédiction inverses

Les prédictions inverses calculées après alignement des réponses pour le model $y = ax + b$ pour chaque principe actif sont présentées dans les tableaux VII et VIII suivants ;

Tableau VII : Prédiction inverses- Dosage de l'acide clavulanique

Niv de Conc j	Répétitions i	Quantités introduites en mg			Moy des $X_{i,j,k}$ introduites			Moy x_j	Prédiction inverses $X_{ijk, calc}$			Moy des prédictions inverses			μ_j calc=1/n $\sum x_{ijk,cal}$
		Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3		Série1	Série2	Série3	Série 1	Série 2	Série 3	
1	1	45,20	45,50	45,10	45,10	45,30	45,13	45,18	44,74	45,71	45,82	44,80	45,91	45,47	45,393
	2	45,00	45,30	45,10					44,94	45,90	44,69				
	3	45,10	45,10	45,20					44,71	46,13	45,89				
2	1	60,00	60,10	60,30	60,07	60,37	60,20	60,21	60,44	60,14	59,37	60,10	59,68	59,96	59,915
	2	60,10	60,50	60,20					60,01	59,45	60,07				
	3	60,10	60,50	60,10					59,86	59,45	60,45				
3	1	75,20	75,20	75,10	75,33	75,30	75,10	75,24	75,01	74,77	74,06	74,93	74,19	73,69	74,270
	2	75,50	75,40	75,20					75,38	74,06	73,11				
	3	75,30	75,30	75,00					74,41	73,75	73,89				
4	1	90,00	90,00	90,10	90,07	90,20	90,17	90,14	89,87	91,00	91,37	89,62	89,84	91,31	90,258
	2	90,20	90,20	90,40					89,41	89,63	91,34				
	3	90,00	90,40	90,00					89,58	88,88	91,22				
5	1	105,50	105,20	105,00	105,43	105,40	105,13	105,32	103,86	102,67	105,95	103,82	103,32	105,42	104,185
	2	105,30	105,60	105,10					103,92	103,71	105,87				
	3	105,50	105,40	105,30					103,68	103,58	104,42				

Tableau VIII : Prédiction inverses- Dosage de l'amoxicilline

Niv de Conc j	Répétitions i	Quantités introduites en mg			Moy des $X_{i,j,k}$ introduites			Moy x_j	Prédiction inverses $X_{ijk, calc}$			Moy des prédictions inverses			μ_j calc=1/n $\sum x_{ijk,cal}$
		Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3		Série1	Série2	Série3	Série 1	Série 2	Série 3	
1	1	30,40	30,60	30,30	30,27	30,47	30,23	30,32	30,88	30,19	30,32	30,96	30,28	30,50	30,581
	2	30,00	30,60	30,10					31,48	30,28	30,52				
	3	30,40	30,20	30,30					30,52	30,39	30,66				
2	1	40,10	40,40	40,10	40,20	40,27	40,13	40,20	40,80	39,83	39,51	40,63	39,86	39,57	40,017
	2	40,20	40,30	40,10					40,63	39,52	40,17				
	3	40,30	40,10	40,20					40,44	40,22	39,02				
3	1	50,20	50,50	50,30	50,20	50,20	50,27	50,22	50,12	50,85	49,81	50,53	50,53	50,24	50,435
	2	50,30	50,00	50,10					50,61	50,37	50,50				
	3	50,10	50,10	50,40					50,87	50,37	50,41				
4	1	60,00	60,10	60,20	60,23	60,17	60,17	60,19	59,85	59,74	60,57	59,68	59,86	60,08	59,875
	2	60,50	60,00	60,00					59,59	59,99	59,70				
	3	60,20	60,40	60,30					59,61	59,86	59,96				
5	1	70,00	70,00	70,20	70,13	70,17	70,13	70,14	69,97	71,04	70,09	69,76	70,71	69,77	70,078
	2	70,30	70,10	70,20					69,63	70,64	69,65				
	3	70,10	70,40	70,00					69,67	70,44	69,57				

4. Fidélité

Les résultats de l'étude de la fidélité sont présentés dans le tableau IX et X ci-après ;

Tableau IX : Résultats de la fidélité pour le dosage de l'acide clavulanique

Niv de Conc	MSM	MSE	MSE ₂	(MSM - MSE)/3	$\sigma^2_{w,j}$	$\sigma^2_{B,j}$	Ecat type de répétabilité $\sigma_{w,j}$	Ecat type intersérie $\sigma_{B,j}$	Ecat type de Fidélité intermédiaire Racine	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
1	0,952	0,171	0,366	0,26	0,171	0,26	0,413	0,51	0,657	0,915	1,453
2	0,137	0,183	0,171	-0,015	0,171	0	0,428	0	0,414	0,71	0,688
3	1,177	0,255	0,486	0,307	0,255	0,307	0,505	0,554	0,75	0,671	0,997
4	2,536	0,404	0,937	0,711	0,404	0,711	0,636	0,843	1,056	0,705	1,171
5	3,592	0,358	1,167	1,078	0,358	1,078	0,598	1,038	1,198	0,568	1,138
									Normes	< 2%	< 5%

Tableau IX : Résultats de la fidélité pour le dosage de l'amoxicilline

Niv de Conc i	MSM	MSE	MSE ₂	(MSM - MSE)/3	$\sigma^2_{w,j}$	$\sigma^2_{B,j}$	Ecat type de répétabilité $\sigma_{w,j}$	Ecat type intersérie $\sigma_{B,j}$	Ecat type de Fidélité intermédiaire	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
1	0,359	0,091	0,158	0,089	0,091	0,089	0,301	0,299	0,424	0,993	1,4
2	0,897	0,162	0,346	0,245	0,162	0,245	0,403	0,495	0,638	1,002	1,587
3	0,084	0,12	0,111	-0,012	0,111	0	0,347	0	0,333	0,69	0,664
4	0,119	0,079	0,089	0,013	0,079	0,013	0,281	0,116	0,304	0,467	0,505
5	0,891	0,069	0,274	0,274	0,069	0,274	0,263	0,523	0,586	0,374	0,835
									Normes	< 2%	< 5%

Discussion : les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaires sont inférieurs aux normes retenues, la méthode est donc jugée fidèle.

5. Exactitude

Les résultats de l'étude de l'exactitude sont présentés dans les tableaux XI et XII suivants ;

Tableau XI : Résultats de l'étude de l'exactitude obtenus pour le dosage de l'acide clavulanique

Niv de Conc i	Répétition	Biais absolu	Biais relatif	Recouvrement	Exactitude relatif ijk			Exactitude relatif ij
					Série 1	Série 2	Série 3	
1	1	0,215	0,477	100,477	-1,014	0,471	1,603	0,353
	2				-0,133	1,334	-0,905	0,099
	3				-0,873	2,275	1,530	0,977
2	1	-0,296	-0,491	99,509	0,729	0,070	-1,536	-0,245
	2				-0,157	-1,728	-0,221	-0,702
	3				-0,405	-1,739	0,587	-0,519
3	1	-0,974	-1,295	98,705	-0,254	-0,578	-1,384	-0,739
	2				-0,163	-1,784	-2,777	-1,575
	3				-1,178	-2,062	-1,477	-1,572
4	1	0,113	0,126	100,126	-0,140	1,111	1,407	0,793
	2				-0,873	-0,627	1,045	-0,152
	3				-0,466	-1,678	1,359	-0,262
5	1	-1,137	-1,079	98,921	-1,555	-2,401	0,909	-1,016
	2				-1,311	-1,790	0,732	-0,790
	3				-1,726	-1,726	-0,832	-1,428

Discussion : l'exactitude pour l'ensemble des valeurs obtenues varie entre -2,777% et 1,603 %

Tableau XII : Résultats de l'étude de l'exactitude obtenus pour le dosage de l'amoxicilline

Niv de Conc j	Répétitio	Biais absolu	Biais relatif	Recouvrement	Exactitude relatif ijk			Exactitude relatif ij
					Série 1	Série 2	Série 3	
1	1	0,259	0,853	100,853	1,583	-1,355	0,055	0,095
	2				4,921	-1,056	1,385	1,750
	3				0,408	0,621	1,201	0,744
2	1	-0,183	-0,455	99,545	1,752	-1,417	-1,472	-0,379
	2				1,074	-1,926	0,173	-0,226
	3				0,353	0,305	-2,930	-0,757
3	1	0,213	0,424	100,424	-0,156	0,700	-0,968	-0,141
	2				0,607	0,743	0,797	0,716
	3				1,532	0,540	0,024	0,699
4	1	-0,313	-0,521	99,479	-0,253	-0,596	0,622	-0,076
	2				-1,508	-0,013	-0,496	-0,672
	3				-0,978	-0,901	-0,556	-0,812
5	1	-0,066	-0,095	99,905	-0,046	1,488	-0,155	0,429
	2				-0,947	0,773	-0,790	-0,321
	3				-0,610	0,055	-0,614	-0,390

Discussion : l'exactitude pour l'ensemble des valeurs obtenues varie entre -1,926 % et 4,921 %

6. Erreur totale et intervalle de tolérance

Les résultats de l'erreur totale et le calcul des limites inférieur et supérieur de l'intervalle de tolérance sont présentés dans les tableaux XIII et XIV ci-dessous.

Tableau XIII : résultats de l'erreur totale et le calcul des limites inférieur et supérieur de l'intervalle de tolérance pour le dosage de l'acide clavulanique

Niv de Conc j	Conc	R _j	B _j	V	Q _t	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
1	45,18	1,525	0,673	3,54	2,353	0,872	1,93	-3,34	4,294
2	60,21	0,000	1,000	7,714	1,895	0,710	1,179	-1,864	0,882
3	75,24	1,204	0,691	3,868	2,353	1,724	2,292	-3,899	1,309
4	90,14	1,759	0,663	3,364	2,353	1,169	1,297	-2,959	3,211
5	105,32	3,010	0,632	2,839	2,92	2,335	2,217	-4,835	2,677

Tableau XIII : résultats de l'erreur totale et le calcul des limites inférieur et supérieur de l'intervalle de tolérance pour le dosage de l'amoxicilline

Niv de Conc.j	Conc	R _j	B _j	V	Q _t	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
1	30,32	0,987	0,708	4,175	2,132	0,683	2,253	-2,444	4,151
2	40,2	1,51	0,674	3,554	2,353	0,821	2,043	-4,623	3,713
3	50,22	0,000	1,000	7,714	1,895	0,546	1,088	-0,902	1,750
4	60,19	0,171	0,88	6,815	1,943	0,617	1,026	-1,570	0,528
5	70,14	3,975	0,62	2,646	2,920	0,652	0,929	-2,861	2,672

Discussion : les intervalles de tolérances pour le dosage des deux principes actifs sont compris dans l'intervalle d'acceptabilité [-5% – 5%].

7. Profil d'exactitude

Les profils d'exactitude correspondant au dosage de chaque principe actif sont présentés dans les figures 4 et 5 suivantes :

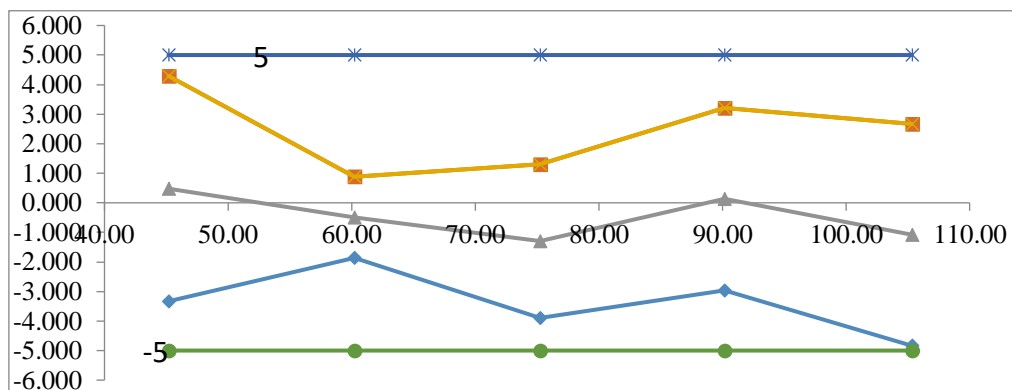


Figure 4 : profil d'exactitude – dosage de l'acide clavulanique

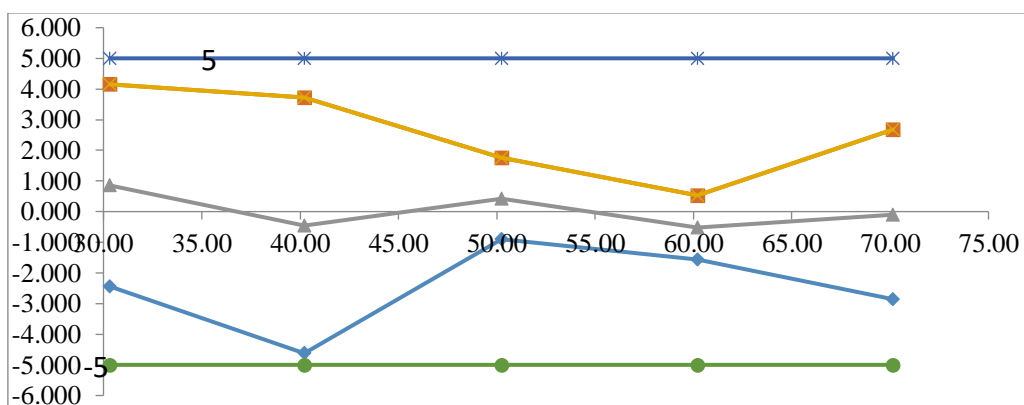


Figure 5 : profil d'exactitude – dosage de l'amoxicilline

8. Linéarité

La linéarité des résultats quantité prédites en fonction des quantités introduites sont présentés dans les figures 6 et 7 ci-après ;

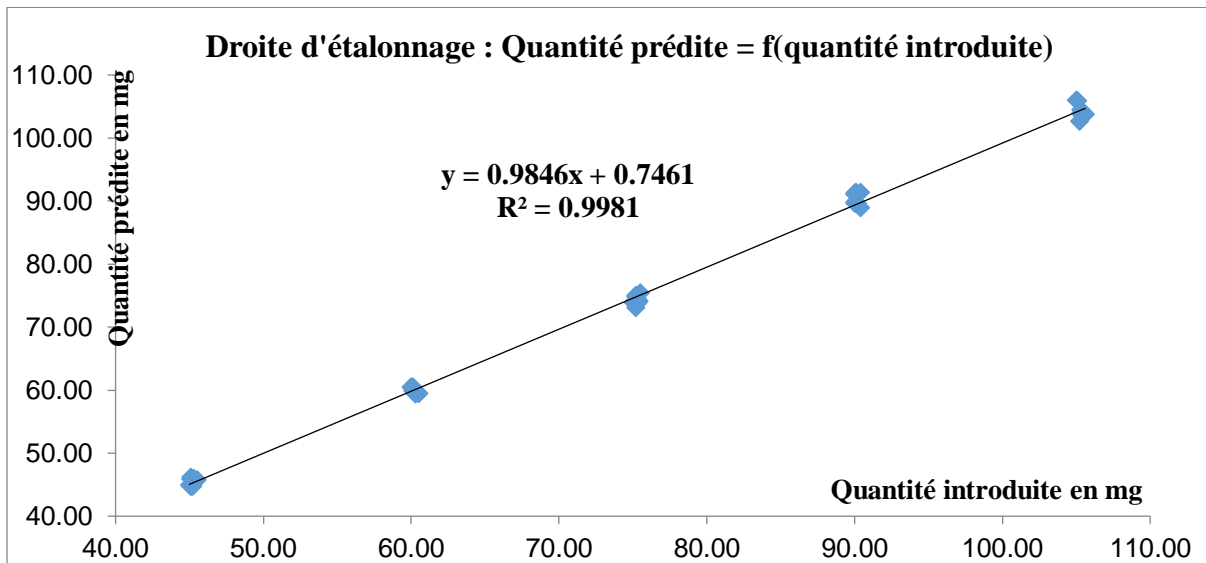


Figure 5 : Linéarité – dosage de l'acide clavulanique

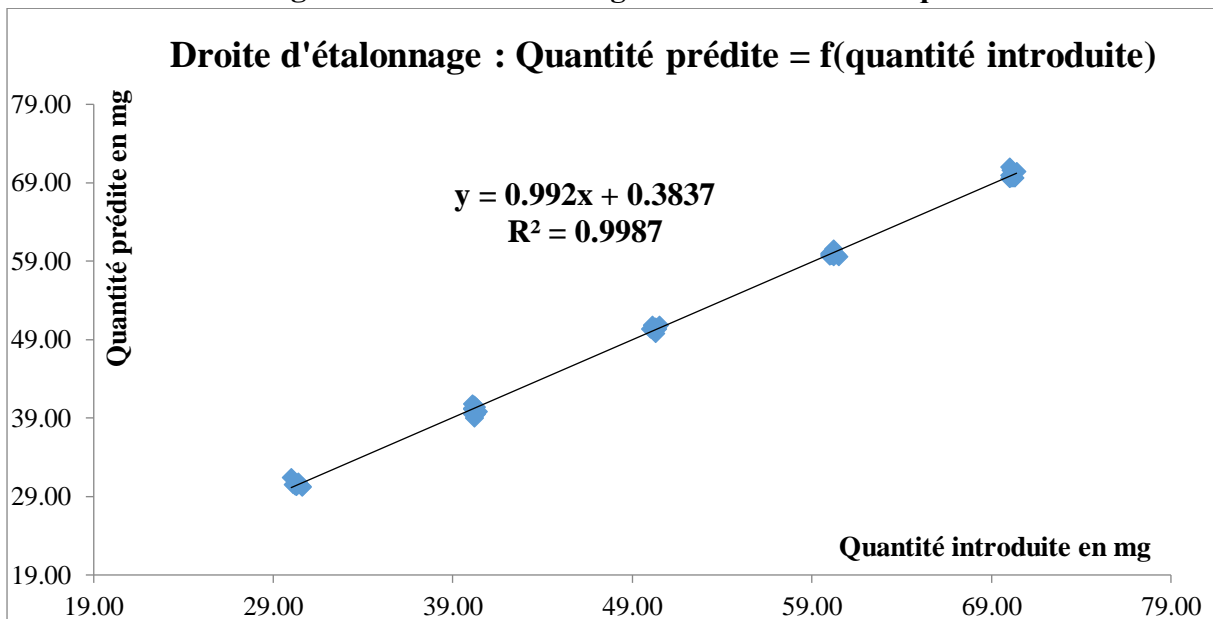


Figure 5 : Linéarité – dosage de l'amoxicilline

Discussion

Les deux droites d'étalonnage, présentent des pentes proches de 1 et des ordonnées à l'origine sont proches de 0.

9. Robustesse

L'étude de la robustesse a été étudiée en considérant un plan d'expérience à trois facteurs 2^3

- **Facteur A** : dosage en principe actif avec un niveau bas de 80% et un niveau haut de 120%.

- **Facteur B** : Débit de la phase mobile, avec un niveau bas de 1 ml/min et un niveau haut de 1,4 ml/min.
- **Facteur C** : Longueur d'onde de détection avec un niveau haut de 223 nm et un niveau bas de 227 nm.

a. Résultats de la robustesse obtenus pour le dosage de l'acide clavulanique.

Tableau XV : Robustesse - acide clavulanique

N° de l'essai	A (teneur en %)	B (Débit de la phase mobile)	C (longueur d'onde)	Masse introduite Echantillon	Masse-Standard	Teneur introduite (%)	Aire échantillon	Aire standard	Masse estimée	Réponse (Teneur en %)
1	80%	1	223	60,20	75,00	80,27	11797640	14750501	59,99	79,98
2	120%	1	223	90,20	75,00	120,27	18158030	14750501	92,33	123,10
3	80%	1,4	223	60,20	75,00	80,27	8662829	10691580	60,77	81,02
4	120%	1,4	223	90,20	75,00	120,27	13026183	10691580	91,38	121,84
5	80%	1	227	60,20	75,00	80,27	12423384	15305973	60,88	81,17
6	120%	1	227	90,20	75,00	120,27	18767003	15305973	91,96	122,61
7	80%	1,4	227	60,20	75,00	80,27	8955637	11044134	60,82	81,09
8	120%	1,4	227	90,20	75,00	120,27	13465542	11044134	91,44	121,92
									Ecartype	22,22
									t°(0,05,7)	2,36

Essai	Facteurs			Interactions				
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
1	-79,98	-79,98	-79,98	79,98	79,98	79,98	-79,98	
2	123,10	-123,10	-123,10	-123,10	-123,10	123,10	123,10	
3	-81,02	81,02	-81,02	-81,02	81,02	-81,02	81,02	
4	121,84	121,84	-121,84	121,84	-121,84	-121,84	-121,84	
5	-81,17	-81,17	81,17	81,17	-81,17	-81,17	81,17	
6	122,61	-122,61	122,61	-122,61	122,61	-122,61	-122,61	
7	-81,09	81,09	81,09	-81,09	-81,09	81,09	-81,09	
8	121,92	121,92	121,92	121,92	121,92	121,92	121,92	
Somme	166,21	-0,99	0,85	-2,92	-1,65	-0,54	1,70	
Effet	20,78	-0,12	0,11	-0,36	-0,21	-0,07	0,21	
Intervalle de confiance	Limite inférieur	2,20	-18,70	-18,47	-18,94	-18,78	-18,64	-18,36
	Limite supérieur	39,35	18,45	18,68	18,21	18,37	18,51	18,79
Facteur signification (S) ou Non significatif (NS)		S	NS	NS	NS	NS	NS	NS

b. Résultats de la robustesse obtenus pour le dosage de l'acide clavulanique.

Tableau XVI : Robustesse - amoxicilline

N° de l'essai	A (teneur en %)	B (Débit de la phase mobile)	C (longueur d'onde)	Masse introduite Echantillon	Masse-Standard	Teneur introduite (%)	Aire échantillon	Aire standard	Masse estimée	Réponse (Teneur en %)
1	80%	1	223	40,00	50,20	79,68	1783372	2266826	39,49	78,67
2	120%	1	223	60,20	50,20	119,92	2821509	2266826	62,48	124,47
3	80%	1,4	223	40,00	50,20	79,68	1292623	1635097	39,69	79,05
4	120%	1,4	223	60,20	50,20	119,92	2039825	1635097	62,63	124,75
5	80%	1	227	40,00	50,20	79,68	1421358	1774312	40,21	80,11
6	120%	1	227	60,20	50,20	119,92	2186617	1774312	61,87	123,24
7	80%	1,4	227	40,00	50,20	79,68	1059463	1327040	40,08	79,84
8	120%	1,4	227	60,20	50,20	119,92	1625037	1327040	61,47	122,46
									Ecart type	23,70
									t°(0,05,7)	2,36

Essai	Facteurs			Interactions				
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
1	-78,67	-78,67	-78,67	78,67	78,67	78,67	-78,67	
2	124,47	-124,47	-124,47	-124,47	-124,47	124,47	124,47	
3	-79,05	79,05	-79,05	-79,05	79,05	-79,05	79,05	
4	124,75	124,75	-124,75	124,75	-124,75	-124,75	-124,75	
5	-80,11	-80,11	80,11	80,11	-80,11	-80,11	80,11	
6	123,24	-123,24	123,24	-123,24	123,24	-123,24	-123,24	
7	-79,84	79,84	79,84	-79,84	-79,84	79,84	-79,84	
8	122,46	122,46	122,46	122,46	122,46	122,46	122,46	
Somme	177,24	-0,39	-1,31	-0,61	-5,75	-1,72	-0,41	
Effet	22,16	-0,05	-0,16	-0,08	-0,72	-0,21	-0,05	
Intervalle de confiance	Limite inférieur	2,34	-19,86	-19,98	-19,89	-20,53	-20,03	-19,86
	Limite supérieur	41,97	19,76	19,65	19,74	19,10	19,60	19,76
Facteur signification (S) ou Non significatif (NS)	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

Discussion

L'intervalle de confiance du facteur dosage ne contient pas la valeur 0, ce qui signifie que la méthode est sensible, donc, non robuste, au dosage en principe actif. Ceci est prévisible car la méthode est jugée linéaire et ne peut être robuste à la teneur en principe actif.

Par contre, les intervalles de confiance des deux paramètres expérimentaux liés aux conditions chromatographiques de la méthode contiennent la valeur cible de 0. Ceci témoigne que les changements délibérés imposés aux deux paramètres débit de la phase mobile et longueur d'onde de détection n'impactent pas les résultats de dosage de l'acide clavulanique et de l'amoxicilline, conséquemment, la méthode est jugée robuste.

IV. CONCLUSION

Le présent travail est réalisé au laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de l'université Mouloud MAMMARI de Tizi Ouzou en collaboration avec l'établissement pharmaceutique Glaxo-Smith-Kline sis à Boudouaou – Algérie.

Dans un premier lieu, après une série d'analyse, nous avons optimisé les conditions analytiques et par suite mis au point une méthode de dosage simultané de l'acide clavulanique et de l'amoxicilline dans une nouvelle forme pharmaceutique, comprimés dosés à 500 mg en amoxicilline et 62,5 mg en acide clavulanique.

La méthode ainsi développée est validée selon le protocole décrit par la commission de la SFSTP en 2006 basé sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

- La méthode s'est révélée spécifique pour le dosage de l'acide clavulanique et l'amoxicilline.
- La fonction de réponse choisie pour chaque principe actif est la fonction linéaire simple $y = ax + b$. Cette fonction a fourni des profils d'exactitude complètement compris dans l'intervalle d'acceptabilité. L'avantage de cette fonction est sa simplicité d'utilisation en pratique.
- Les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire sont tous inférieurs aux normes retenues et ce, pour les deux principes actifs. La méthode est donc jugée fidèle.
- Les taux de recouvrement pour le dosage des deux principes actifs avoisinent les 100% avec une valeur inférieure de 98,705% et une valeur supérieure de 100,477% pour l'acide clavulanique et une valeur inférieure de 99,479% et une valeur supérieure de 100,853% pour l'amoxicilline.
- Les profils d'exactitude pour le dosage des deux principes actifs sont compris dans l'intervalle d'acceptabilité de $\pm 5\%$.
- La méthode est jugée linéaire pour les deux principes actifs dans un intervalle de dosage de 60 à 140%.
- La méthode est robuste pour le changement délibéré deux paramètres de la méthode en l'occurrence, le débit de la phase mobile et la longueur d'onde de détection.
- La stabilité des solutions a été juste envisagée dans le passeur échantillon, les deux principes actifs sont restés stables durant l'injection de chaque série de validation. Par ailleurs, la stabilité à température ambiante et dans les conditions de réfrigération n'ont pas été étudiées, l'acide clavulanique est connu pour sa dégradation, il est donc recommandé de préparer les solutions de façon extemporanée en analyse de routine.

La méthode de dosage simultané de l'acide clavulanique et de l'amoxicilline dans les comprimés dosés à 500 mg d'amoxicilline et 62,5 mg d'acide clavulanique par HPLC est considérée comme valide dans un intervalle de 60 à 140%. Avec une valeur nominale de 0,5 mg/ml en amoxicilline et 0,0625 mg/ml en acide clavulanique.

References bibliographies:

1. Fa H. OTHE IMPACT OF ROUTINE ADMISSION CHEST X-RAY FILMS ON PATIENT CARE.
2. Geddes AM, Klugman KP, Rolinson GN. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Dec;30:109–12.
3. The Clinical Pharmacokinetics of a New Pharmacokinetically Enhanced Formulation of Amoxicillin/Clavulanate.
4. Gaikwad A, Gavali S, Narendiran, Katale D, Bonde S, Bhadane RP. An LC–MS–MS method for the simultaneous quantification of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma and its pharmacokinetic application. *J Pharm Res*. 2013 Aug;6(8):804–12.
5. Yaméogo J, Zombré M, Zimé Diawara H, Sombié C, Goumbri WB, Zoungrana Somé W, et al. Quality and in vitro bioequivalence evaluation of different brands of amoxicillin + clavulanic acid (500 + 62.5) mg tablets distributed in Burkina Faso. *J Afr Technol Pharm Biopharmacie JATPB*. 2023 Nov 15;2(2):1–10.
6. R Gaur, M Azizi, J Gan, P Hansal, K Harper, R Mannan, A Panchal, K Patel, M Patel, N Patel, J Rana, A Rogowska. *British Pharmacopoeia 2009*. 6 volumes. The Stationery Office, London, 2009.
7. GHERIBI, Khadidja et ZOUBIRI, Fatma Zohra. Validation des methodes analytiques en industrie pharmaceutique. These du diplome de Docteur en Pharmacie, Universite SAAD DAHLAB, BLIDA, 2018.
8. Bellur Atici E, Yazar Y, Ağtaş Ç, Ridvanoğlu N, Karlığa B. Development and validation of stability indicating HPLC methods for related substances and assay analyses of amoxicillin and potassium clavulanate mixtures. *J Pharm Biomed Anal*. 2017 Mar;136:1–9.
9. Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewe W, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches. 2003;13.
10. Manuel d'utilisation de l'appareil HPLC SHIMADZU LC20.
11. Gerville-Réache L, Couallier V, Bayle F. Approches comparées sur l'estimation d'une probabilité de défaillance: cas des échantillons totalement censurés.