

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : *CHIMIE PHARMACEUTIQUE*

THEME

*Mise au point d'une méthode de dosage par HPLC à détecteur UV de
l'AZITHROMYCINE® dans sa forme pharmaceutique (comprimé
enrobé 500mg)*

Présenté par : SERRADJ Katia et OUAZAR Sarah

Soutenu publiquement, le 14/07/2021 devant le Jury composé de :

<i>Noms et Prénoms</i>	<i>Grade</i>	<i>Affiliation</i>	<i>Qualité</i>
Mme IDRIS Imane	MCB	UMMTO	Présidente
Dr BEN SI SAID Hassan	MACU	UMMTO	Examineur
Mlle KHIAR Chahinaz	MCB	UMMTO	Promotrice
Mr BOUARIOUA Karim	Responsable d'optimisation analytique	BEKER	Co-promoteur

Promotion : 2020/2021

Remerciements

Nos remerciements vont tout premièrement au bon dieu tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Nous remercions : **Mme IDRIS Imane** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury. Mes remerciements s'adressent à Mr : **BEN SI SAID Hassan** d'avoir acceptées d'examiner notre travail.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire **BEKER**. Nous tenons ici à exprimer nos remerciements à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'avancer de ce travail, que ce soit sur un plan scientifique ou humain.

Nos sincères remerciements et nos reconnaissances sont adressés aux responsables de **BEKER** qui ont accepté la réalisation de ce modeste travail au sein de leur usine.

En premier lieu, nous tenons à remercier sincèrement Monsieur : **BOUARIOUA Karim** responsable Optimisation analytique pour la confiance qu'il nous a témoigné en nous donnant la chance d'effectuer le stage au sein de son laboratoire.

Nous souhaitons associer à ces remerciements **Khalida, Khadir Fares, Housseem, Abdelkader, Kahina, Soumia et Nabila** analystes contrôle qualité, qui nous ont suivis pendant toute la durée de ce travail, nous les remercions de nous avoir enrichis d'informations si précieuses et de nous avoir soutenus dans les moments difficiles.

Nous remercions plus particulièrement toute l'équipe du laboratoire du contrôle qualité : **Assia, Nassim, Dalila, Djilali et Samir**.

Nous adressons également notre profonde gratitude à tous les techniciens de l'assurance qualité qui ont été gentils, sympathiques et serviables merci **Ahmed et Mohamed**.

Nous remercions toute personne travaillant à **BEKER** ; employés des autres départements qui ont eu une attention ou un mot sympathique à notre égard et qui nous ont particulièrement touché ce jour-là.

Nos profonds remerciements s'adressent particulièrement à Notre promotrice Dr : **KHIAR Chahinaz**. Nous tenons à la remercier pour son aide, son orientation, ses compétences et ses précieux conseils qu'elle nous a prodigué tout au long de notre travail, mais aussi et surtout pour ses qualités humaines.

Enfin, nous voudrions remercier tout particulièrement nos familles auprès de qui on a trouvé un soutien sans commune mesure.



Dédicaces

Grâce à Allah le tout puissant, j'ai pu achever la réalisation de cet humble travail, que je tiens chaleureusement à le dédier :

A ceux que tous les mots ne suffisent pour leurs exprimer mon amour « mes chers parents » :

A qui je dois tout dans la vie, pour leurs confiances, leurs sacrifices consentis, leurs amours inestimables qui m'accompagne au quotidien et leurs soutiens et encouragements dans mes études qui n'ont pas toujours été faciles.

A mes deux petites sœurs :

« *Asmaa et Mélissa* »

Pour leurs soutiens et leurs patiences face à mon impatience et mes caprices.

À toutes ma famille :

A la mémoire de ma grand-mère maternelle qu'Allah l'accueille dans son vaste paradis, mon grand-père et ma grand-mère, mes oncles, tantes, mes cousins et cousines « *Aziza, Kahina, Sabrina et Abd-El-Karim* » pour leurs bienveillances et affection inconditionnelle.

À mes ami(e)s :

« *Sarah, Kamélia, Khalida, Nassima, Anissa, Yacine, Sofiane, Mustapha, Mehdi et Hacene* » Pour leurs aides morales leurs écoutes, leurs présences et leurs nombreux encouragements et conseils précieux tout au long de cette période.

À ma compagne de travail : « Sarah OUAZAR »

Avec laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à réaliser ce travail, cette année fut riche en émotions et des moments partagés, ainsi pour tout ce que l'on a vécu et l'ensemble de nos « œuvres » au cours de toutes ces années.

Katia. S



Dédicaces

C'est avec amour, respect et gratitude que je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents, pour toutes les peines qu'ils ont endurées en m'accompagnant dans ce long parcours, qui m'ont toujours encouragé, pour leurs sacrifices, leurs soutiens et leurs précieux conseils durant toute ma vie. Vous avez su me hisser vers le haut pour atteindre mon objectif et être celle que je suis aujourd'hui, Que Dieu, le tout puissant, vous accorde santé, bonheur et longue vie.

A mes chères sœurs **Amel** et **Melissa**, vous êtes les prunelles de mes yeux, pour votre encouragement qui m'a été d'un grand soutien.

A la mémoire de mes grands-parents maternels **YAYA Oueddi**, **DJEDDI Ali** et ma chère tante **Djegdjiga** qui sont toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que DIEU vous accueille dans son éternel paradis.

A ma grand-mère paternelle, que DIEU la garde.

A mes chères tantes **Aziza** et **Zazou**, mes deuxièmes mamans, celles, qui m'ont soutenu, encouragé et forgé, vous êtes un symbole de mon enfance que DIEU vous protège.

A mes cousins, cousines particulièrement mon cher **Messaoud** à qui je souhaite un avenir plein de réussite et de bonheur.

A mes autres tantes et oncles qui font partie intégrante de ma famille que j'aime beaucoup.

A mon binôme **Katia**, tout au long de ce travail nous avons passé des moments de folie qui font du bien quand la fatigue et le stress nous envahissaient, nous avons traversé ensemble ce chemin et passé par des hauts et des bas pour mener à bien ce travail, on va enfin pouvoir souffler car cette fois-ci c'est terminé!

A tous ceux dont l'oubli de la plume n'est pas celui du cœur.

Sarah.O

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1. Propriétés physico- chimiques de l'AZITHROMYCINE.....	4
Tableau I.2. Grandeurs caractéristiques.....	12

Chapitre II

Tableau II.1. Paramètres de vérification pour l'évaluation d'un système chromatographique selon l'USP.....	21
---	----

Chapitre III

Tableau III.1. Matériels et verreries utilisés.....	27
Tableau III.2. Conditions chromatographiques de la méthode de dosage par HPLC de l'AZITHROMYCINE dans les comprimés dosés à 500 mg.....	28
Tableau III.3. Résultats de la variation de la concentration de K ₂ HPO ₄	32
Tableau III.4. Résultats de la variation des proportions de la phase mobile.....	33
Tableau III.5. Résultats de la variation du pH.....	35
Tableau III.6. Résultats de la variation du débit.....	36
Tableau III.7. Résultats de la variation de la température.....	38
Tableau III.8. Résultats de la variation de la marque de la colonne.....	39
Tableau III.9. Calcul du % coefficient de variation.	41
Tableau III.10. Calcul d'As, Nth, Coefficient de variation et R%.	42
Tableau III.11. Surfaces des pics principe actif et forme reconstituée.....	44
Tableau III.12. Paramètres de la droite de régression (Linéarité).	45
Tableau III.13. Surfaces des pics de précision (PA).	46
Tableau III.14. Surfaces des pics de répétabilité (PA).	46
Tableau III.15. Surfaces des pics de la reproductibilité (PA).....	47
Tableau III.16. Surfaces des pics de précision (FR).....	47
Tableau III.17. Surfaces des pics de répétabilité (FR).	47
Tableau III.18. Surfaces des pics de la reproductibilité (FR).....	48
Tableau III.19. Paramètres de l'exactitude du principe actif.....	49
Tableau III.20. Paramètres de l'exactitude de forme reconstituée.	50
Tableau III.21. Comparaison de l'exactitude de la forme constituée et principe actif avec les normes d'acceptation.....	52

Tableau III.22. Comparaison entre les conditions optimisées au sein du laboratoire BEKER et celle publiée dans la dernière version de la pharmacopée américaine.52

Liste des schémas

Chapitre I

Schéma I.1. Classification des méthodes chromatographiques.....	6
--	---

Chapitre II

Schéma II.1. Critères de la validation.	23
---	----

Chapitre III

Schéma III.1. Protocole expérimental de préparation de la phase mobile.....	30
--	----

Schéma III.2. Protocole expérimental de la préparation de la solution standard.....	30
--	----

Schéma III.3. Protocole expérimental de la préparation de la solution du placebo.....	31
--	----

Schéma III.4. Protocole expérimental de la préparation de la solution échantillon.....	40
---	----

Liste des figures

Chapitre I

Figure I.1. AZITHROMYCINE ® BEKER.....	3
Figure I.2. Structure chimique de l'AZITHROMYCINE.....	4
Figure I.3. Instrumentation fonctionnelle de la HPLC.....	9
Figure I.4. Fonctionnement du système de pompage en HPLC.....	9
Figure I.5. Fonctionnement de l'injecteur à boucle.	10
Figure I.6. Différents compartiments de la colonne.....	10
Figure I.7. Chromatogramme présentant le t_m , t_r et les ω	12
Figure I.8. Différents paramètres modélisables pour un chromatogramme	13
Figure I.9. Exemple d'un pic asymétrique.	14

Chapitre II

Figure II.1. Effet du diamètre des particules remplissant la phase stationnaire sur N.....	17
Figure II.2. Courbe de Van Deemter.	18
Figure II.3. Table de miscibilité des solvants en Chromatographie liquide haute performance.	20

Chapitre III

Figure III.1. Dispositif de l'appareillage de la HPLC.	27
Figure III.2. Colonne MERCK.	29
Figure III.3. Chromatogramme de concentration de 0.02M ($K_2 HPO_4$).	32
Figure III.4. Chromatogramme de concentration de 0.03M ($K_2 HPO_4$).	32
Figure III.5. Chromatogramme de concentration de 0.04M ($K_2 HPO_4$).	32
Figure III.6. Chromatogramme phase mobile [$K_2 HPO_4$ / ACN (35/65) ; V/V].....	33
Figure III.7. Chromatogramme phase mobile [$K_2 HPO_4$ / ACN (65/35) ; V/V].....	33
Figure III.8. Chromatogramme pH=7,4.....	34
Figure III.9. Chromatogramme pH=7,5.....	34
Figure III.10. Chromatogramme pH=7,6.....	35
Figure III.11. Chromatogramme débit 0.5 ml/min.	36
Figure III.12. Chromatogramme débit 1 ml/min.	36
Figure III.13. Chromatogramme débit 1.5 ml/min.	36

Figure III.14. Chromatogramme température 36° C.	37
Figure III.15. Chromatogramme température 40° C.	37
Figure III.16. Chromatogramme température 44° C.	37
Figure III.17. Chromatogramme colonne KNAUER.	38
Figure III.18. Chromatogramme colonne MERCK	38
Figure III.19. Chromatogramme de 1 ^{ère} injection du principe actif.....	40
Figure III.20. Chromatogramme de 2 ^{ème} injection du principe actif.	40
Figure III.21. Chromatogramme de 3 ^{ème} injection du principe actif.	40
Figure III.22. Chromatogramme de 4 ^{ème} injection du principe actif.	41
Figure III.23. Chromatogramme de 5 ^{ème} injection du principe actif.	41
Figure III.24. Chromatogramme du blanc.	43
Figure III.25. Chromatogramme du standard.	43
Figure III.26. Chromatogramme du placebo.	43
Figure III.27. Courbes d'étalonnage de l'AZITHROMYCINE dans la solution du principe actif et la forme reconstituée.	45
Figure III.28. Tracé du profil d'exactitude du principe actif.	50
Figure III.29. Tracé du profil d'exactitude de la forme reconstituée.....	51

Liste des abréviations

% : pourcent.

a : Pente de la droite de régression linéaire.

AA : Acide aminé.

As : Facteur d'asymétrie.

b : Ordonnée à l'origine de la droite de régression.

C° : Degré Celsius.

C18 : Octadecyl Cilyle.

CG : Chromatographie Gazeuse.

CGS : Chromatographie Gaz/Solide.

CL : Chromatographie Liquide.

CLL : Chromatographie Liquide/Liquide.

CLS : Chromatographie Liquide/Solide.

cm : Centimètre.

Cp : Comprimé.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

CPL : Chromatographie en Phase Liquide.

CPS : Chromatographie en Phase Solide.

CV : Coefficient de variation.

d : Distance entre le perpendiculaire abaissé du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.

d : droite de régression linéaire.

DEC : Détecteur électrochimique.

D.C.I : Dénomination Chimique Internationale.

EA : ERYTROMYCINE A.

g : gramme

H : Hauteur de plateau théorique.

h : Hauteur du pic.

H₂O : L'eau pure.

HEPT : Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique.

HPLC : High Performance Liquid Chromatography.

Inj : injection.

K : Coefficient de distribution.

K₀ : Coefficient de partage.

K₁ : Coefficient de distribution de l'espèce le plus retenue.

K₂ : Coefficient de distribution de l'espèce la plus rapidement éluée.

K' : Facteur de rétention ou de capacité.

λ : Longueur d'onde.

l : Litre.

L : Longueur de la colonne.

m : Masse.

M : Concentration molaire.

mg : Milligramme.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

MP : Matière première.

mol : Mole.

MS : Spectromètre de masse.

N : Efficacité d'une colonne.

Nm : nanomètre.

Nth : Nombre de plateaux théorique.

P : Pression.

PA : Principe actif.

Ph.Eur : Pharmacopée Européenne.

pH : Potentiel d'hydrogène.

PF : Produit fini.

R : Coefficient de corrélation.

RS : Résolution.

STD : standard.

T° : Température.

Tm : Temps mort.

Tr : Temps de rétention.

Tr1 : Temps de rétention du pic de référence (celui de la substance à examiner).

Tr2 : Temps de rétention du pic considéré.

U : Vitesse linéaire de la phase mobile.

USP : United States Pharmacopeia.

UV : Ultraviolet.

µl : Microlitre

v : Débit de la phase mobile.

Vopt : Vitesse optimale.

W_{0.05} : Largeur du pic au vingtième de sa hauteur.

W/ω : Largeur du pic à la base.

ω^{1/2} : Largeur de pic à mi-distance.

ωh : Largeur du pic à mi-hauteur.

σ : Ecart type.

Øm : phase mobile.

Øs : Phase stationnaire.

Sommaire

INTRODUCTION.1

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART

1. GENERALITES SUR L'AZITHROMYCINE	3
I.1. Définition.	3
I.2. Données pharmaceutiques et chimiques	3
I.2.1. Présentation de l'AZITHROMYCINE.	3
I.2.2. Synthèse de l'AZITHROMYCINE.	4
I.2.3. Propriétés physico-chimiques.	4
I.3. Classe thérapeutique.	5
II. GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE.	5
II.1. Définition.	5
II.2. Classification des techniques chromatographiques.	5
II.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC).	7
II.3.1. Définition.	7
II.3.2. Historique.	7
II.3.3. Principe	8
II.3.4. Appareillage.....	8
II.3.5. Grandeurs caractéristiques.....	11
II.3.6. Analyse d'un chromatogramme.....	13
II.3.7. Domaines d'application de la HPLC.	14
II.3.7.1. L'agroalimentaire.	14
II.3.7.2. La cosmétologie.....	14
II.3.7.3. L'environnement.....	15

II.3.7.4. Pharmaceutique.	15
--------------------------------	----

CHAPITRE II : MISE AU POINT D'UNE METHODE
D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

I.OPTIMISATION DES CONDITIONS OPERATOIRES D'UNE METHODE CHROMATOGRAPHIQUE.	16
I.1. Paramètres liés à l'optimisation.	16
I.1.1 Augmentation de l'efficacité d'une colonne.	16
I.1.1.1. Augmentation du nombre de plateau théorique.	16
I.1.1.2. Diminution de la hauteur équivalente à un plateau théorique.	17
I.1.1.3. Inconvénient de l'augmentation de l'efficacité d'une colonne.	17
I.1.2. Augmentation de la vitesse de la phase mobile.	18
I.2. Paramètres les plus sensibles permettant une meilleure optimisation de la méthode d'analyse.	19
I.2.1. Modification du pH de la phase mobile.	19
I.2.2 Modification de la polarité de la phase mobile.	19
I.2.3. Optimisation de la température	20
I.2.4. Limite de la pression.	20
II. TEST DE CONFORMITE DU SYSTEME CHROMATOGRAPHIQUE (SYSTEM SUITABILITY TEST).	20
II.1. Définition	21
II.2. Paramètres de vérification pour l'évaluation d'un système chromatographique.	21
III. VALIDATION D'UNE METHODE CHROMATOGRAPHIQUE.	21
III.1. Définition.	22
III.2. Objectifs de la validation analytique.	22
III.3. Critères de validation.	22
III.3.1. Spécificité.	23
III.3.2. Sensibilité.	23
III.3.3. Fidélité.	24

III.3.4. Linéarité.....	24
III.3.5. Exactitude.....	24
III.3.6. Seuil de détection.....	25
III.3.7. Seuil de quantification.....	25
III.3.8. Robustesse.....	25

CHAPITRE III : METHODOLOGIE, RESULTATS ET DISCUSSIONS

I.OPTIMISATION DES PARAMETRES OPERATOIRES DE LA HPLC.....	26
I.1. Matériels et produits chimiques.....	26
I.1.1. Réactifs.....	26
I.1.2. Appareillages et verreries.....	27
I.2. Méthodes.....	27
I.2.1. Préparation des solutions.....	29
I.3. Recherche des conditions optimales, résultats et discussions.....	31
I.3.1 Variation de la concentration de $K_2 HPO_4$	31
I.3.2. Variation des proportions de la phase mobile.....	33
I.3.3. Variation du pH du tampon de la phase mobile.....	34
I.3.4. Variation du débit.....	35
I.3.5. Variation de la température.....	37
I.3.6. Variation de la marque de la colonne.....	38
II. TEST DE CONFORMITE DE SYSTEME.....	40
III. METHODOLOGIE DE LA VALIDATION.....	42
III.1 Spécificité.....	42
III.2. Linéarité.....	43
III.3. Fidélité.....	46
III.4. Exactitude.....	49

IV. SYNTHÈSE DES RESULTATS.....52

CONCLUSION.54

GLOSSAIRE

ANNEXES

Introduction

INTRODUCTION

Notre époque a connu une crise globale ayant mené à de grandes pertes humaines. En effet, une pandémie dépassant bien plus qu'une crise sanitaire seulement, mettant sous pression la plupart des pays du monde entier, créant ainsi dans son sillage d'autres crises tel un effet « domino ». Par conséquent, des impacts sociaux, économiques et politiques dévastateurs ont été engendrés. Il s'agit de la « pandémie Covid-19 »

La première alerte fut lancée en décembre 2019 à Wuhan (Chine) qui s'est étendue au reste du monde début 2020. Il est important de noter que la maladie Covid-19 est une maladie infectieuse due à un coronavirus provoqué par SARS-COV-2. De ce fait et en se basant sur l'état actuel des connaissances, il a été retenu de prescrire un traitement spécifique à tous les cas liés à cette maladie (infection). Ce dernier fait appel à plusieurs types de médicaments tels que les antibiotiques notamment la molécule de type AZITHROMYCINE.

Dans ce contexte, de nombreux médecins à travers le monde ont fait état de retours d'expérience positifs sur son utilisation et ce grâce à sa grande efficacité.

D'autre part, en raison de l'accroissement des demandes de l'AZITHROMYCINE®, les industries pharmaceutiques ont été confrontées à la nécessité de mettre en place des outils d'assurance qualité bien conçu ; permettant de construire la qualité et de conserver les standards depuis la conception jusqu'à la fin de la commercialisation de ce dernier. En effet, la plupart des méthodes utilisées, aujourd'hui, dans le contrôle du médicament, font appel à l'analyse instrumentale telle que la chromatographie incluant l'établissement des deux étapes importantes de l'optimisation et de la validation du processus.

De ce fait, l'étape de l'optimisation est consacrée à la variation des conditions chromatographiques dans l'objectif de trouver et fixer les différents paramètres optimaux suivit de l'étape de validation analytique. En effet, cette dernière est considérée comme un outil de pilotage des processus analytiques, de ce fait, l'obtention de résultats fiables et exacts reflétant au mieux les normes et les règles de bonne pratique de laboratoire et de fabrication de médicaments.

Dans cette perspective, nous nous sommes intéressées à la mise au point d'une méthode de dosage par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de l'AZITHROMYCINE® fabriqué par les laboratoires BEKER® et effectuée au sein du laboratoire de contrôle qualité de ce dernier. L'intérêt de cette étude réside dans la recherche de nouveaux paramètres optimaux de la méthode d'analyse par HPLC pouvant être plus avantageux et précis ainsi que sa validation.

Par conséquent, ce présent mémoire est scindé en trois chapitres :

INTRODUCTION

Le premier chapitre de ce manuscrit présente un état de l'art sur des généralités sur l'AZITHROMYCINE ® ainsi que les techniques chromatographiques et leurs domaines d'application.

Le second chapitre aborde de façon détaillée les différents paramètres d'une optimisation chromatographique ainsi que la mise au point de la méthode de conformité et de validation.

Le troisième et dernier chapitre est consacré à la partie expérimentale, dédiée à l'aspect pratique du travail effectué, les protocoles expérimentaux ainsi que les résultats obtenus.

Ce manuscrit sera clôturé par une conclusion générale.

Chapitre I

Etat de l'art

Avec l'augmentation de la production des produits pharmaceutiques, est venue la législation et les procédés afin d'assurer la production correcte et la pureté des médicaments distribués. Ainsi, les méthodes chromatographiques se sont avérées parmi les méthodes les plus utilisées et fiables afin de vérifier la teneur et la haute qualité des médicaments fabriqués.

I. GENERALITES SUR L'AZITHROMYCINE

I.1. Définition

L'AZITHROMYCINE est un antibiotique de la famille des macrolides appartenant à des azalides, dérivés de l'*Erythromycine A (EA)* d'une manière semi-synthétique,^{1, 2} avec un spectre d'activité élargi et des caractéristiques pharmacocinétiques tissulaires améliorées par rapport à l'*EA*.²

Ce médicament est connu pour son activité contre certains organismes à Gram négatif associés aux infections des voies respiratoires, en particulier l'*Haemophilus influenzae*. De plus, l'AZITHROMYCINE a une activité similaire à d'autres macrolides contre le *streptococcus pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis*, et également contre des agents pathogènes atypiques tels que *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae*.³

I.2. Données pharmaceutiques et chimiques

I.2.1. Présentation de l'AZITHROMYCINE

L'AZITHROMYCINE® est un médicament générique commercialisé en Algérie par les laboratoires BEKER® (figure I.1) sous forme de comprimé (Cp) enrobé sécable avec un dosage de 500mg, et administré par voie orale.



Figure I.1. AZITHROMYCINE BEKER®

¹ C.J. Dunn, L.B Bradell, Drug evaluation.,1996, 51,483.

² J.P. Euzéby : Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale,2006-2007.

³ C.H. Ballou G.W. Amsdem, The Annals of pharmacotherapy,1992,26,1253.

I.2.2. Synthèse de l'AZITHROMYCINE

La semi-synthèse de l'AZITHROMYCINE comprend l'oxydation de l'EA, suivie d'un réarrangement de Beckmann pour donner l'EA iminoéther. De plus, la réduction, suivie de la méthylation d'Eschweiler-Clark, aboutit finalement à l'AZITHROMYCINE.³

Ainsi, l'AZITHROMYCINE (figure I.2) se compose d'un cycle lactone macrocyclique à 15 chaînons sur lequel deux fragments de sucre sont liés. De ce fait, un sucre aminé, la D-désosamine, est attaché par une liaison β -glycosidique en position Carbone 5 (C₅) du cycle lactone. Un sucre neutre, le L-cladinose, est attaché via une liaison α -glycosidique en position Carbone 3 (C₃) du cycle lactone.³

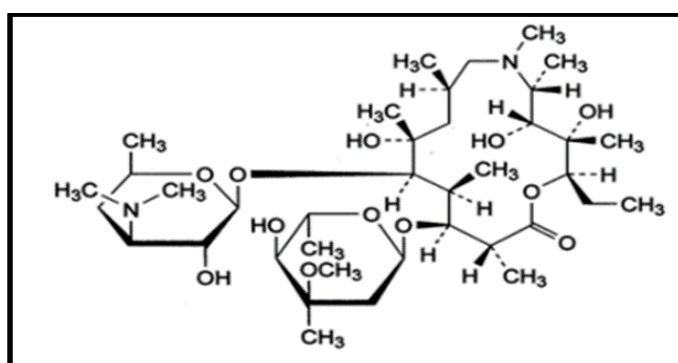


Figure I.2. Structure chimique de l'AZITHROMYCINE

I.2.3. Propriétés physico-chimiques

Dans le tableau I.1 sont résumées les principales caractéristiques chimiques et physiques de l'AZITHROMYCINE.

Tableau I.1. Propriétés physico- chimiques de l'AZITHROMYCINE

Propriétés		Caractéristiques
Chimiques	Nom propre	AZITHROMYCINE
	Nom chimique	(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-didésoxy-3-C-méthyl-3-O-méthyl- α -L-ribo-hexopyranosyl) oxy] -2-éthyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptaméthyl-11-[[3,4,6-tridésoxy-3-(diméthylamino)- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadécane-15-one. ⁴
	Formule brute	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂
	Masse molaire	749g/mol

	pKa	8,74 à 25 °C
Physiques	T° de fusion	113 à 115°C
	Solubilité	Soluble dans le méthanol, l'acétone, chloroforme et peu soluble dans l'eau.

I.3. Mécanisme d'action

L'AZITHROMYCINE est un antibiotique agissant sur les infections bactériennes en inhibant la synthèse des protéines chez les bactéries. En raison des différences dans la façon dont les protéines sont fabriquées chez les bactéries et les humains, les antibiotiques macrolides n'interfèrent pas avec la capacité de l'homme à synthétiser des protéines.

D'autre part, l'AZITHROMYCINE se fixe à la sous-unité ARNr 50s du ribosome bactérien 70s, inhibant donc la synthèse des protéines dépendant de l'ARN.⁴ Ainsi, la molécule d'AZITHROMYCINE inhibe la traduction de l'ARNm dans les cellules bactériennes pendant l'étape d'élongation de la chaîne le blocage de la transpeptidation.

Par ailleurs, l'AZITHROMYCINE est rapidement absorbé et largement distribué dans les tissus en se concentrant dans les cellules. Ainsi, les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes en 2 à 3 heures.⁵

II. GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie a pris une place considérable dans les laboratoires d'analyse depuis son invention il y a plus de 100 ans. En effet, elle compte plusieurs types, classés selon la nature des phases stationnaires (\emptyset_s) et mobiles (\emptyset_m).

II.1. Définition

La chromatographie est une technique de séparation et d'analyse qualitative et quantitative dans laquelle l'échantillon contenant une ou plusieurs substances est entraîné par un courant de \emptyset_m . Cette dernière peut être un liquide, gaz ou fluide super critique, le long d'une \emptyset_s , qui peut être du papier, gélatine, de la silice, un polymère, silice greffé...etc.

D'autre part, chaque substance se déplace à une vitesse donnée dépendant de ses caractéristiques (polaire, non polaire, ionique ...etc) et celles des deux phases.⁶

II.2. Classification des techniques chromatographiques

⁴ D. Irin, A. Tasnuva, M.H. Faisal, H. Moynul, S.F. Chowdhury, G. Mahjabeen, S.M. Ashraful Islam, International J. of pharmaceutical of sciences and research.,**2012**, 4, 282.

⁵ D. Debremaeker, D. Visky, H.K. Chepkwony, A. Van Schepdael, E. Roets, and J. Hoogmartens ., Rapid Communications in Mass Spectrometry., **2003**, 17, 342

⁶ B.A. Bidlingmeyer, Practical HPLC Methodology and applications., Ed. ; Wiley,**1992**, pp200.

La chromatographie analytique est utilisée pour identifier ou doser les composés chimiques d'un mélange et évaluer leurs concentrations. Ainsi, il est possible de classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation (schéma I.1).^{7, 8, 9,}

-
- ⁷ G. Burgot, J.L. Burgot, Méthodes instrumentales d'analyse chimiques et applications, 3e Ed.; Tec & doc, Lavoisier Inc : Paris, **2006** ; pp7-9. Ch 1.
- ⁸ Y.V. Kazakevich, L. Rosario, HPLC for Pharmaceuticals Scientists, Ed.; Wiley interscience, **2007**; pp 4.Ch.1.
- ⁹ JD. Barnes, RC. Denney, J. Mendham, MJK. Thomas, Analyse Chimique Quantitative de VOGEL, 1^e Ed. ; de Boeck, **2008** ; pp 283.

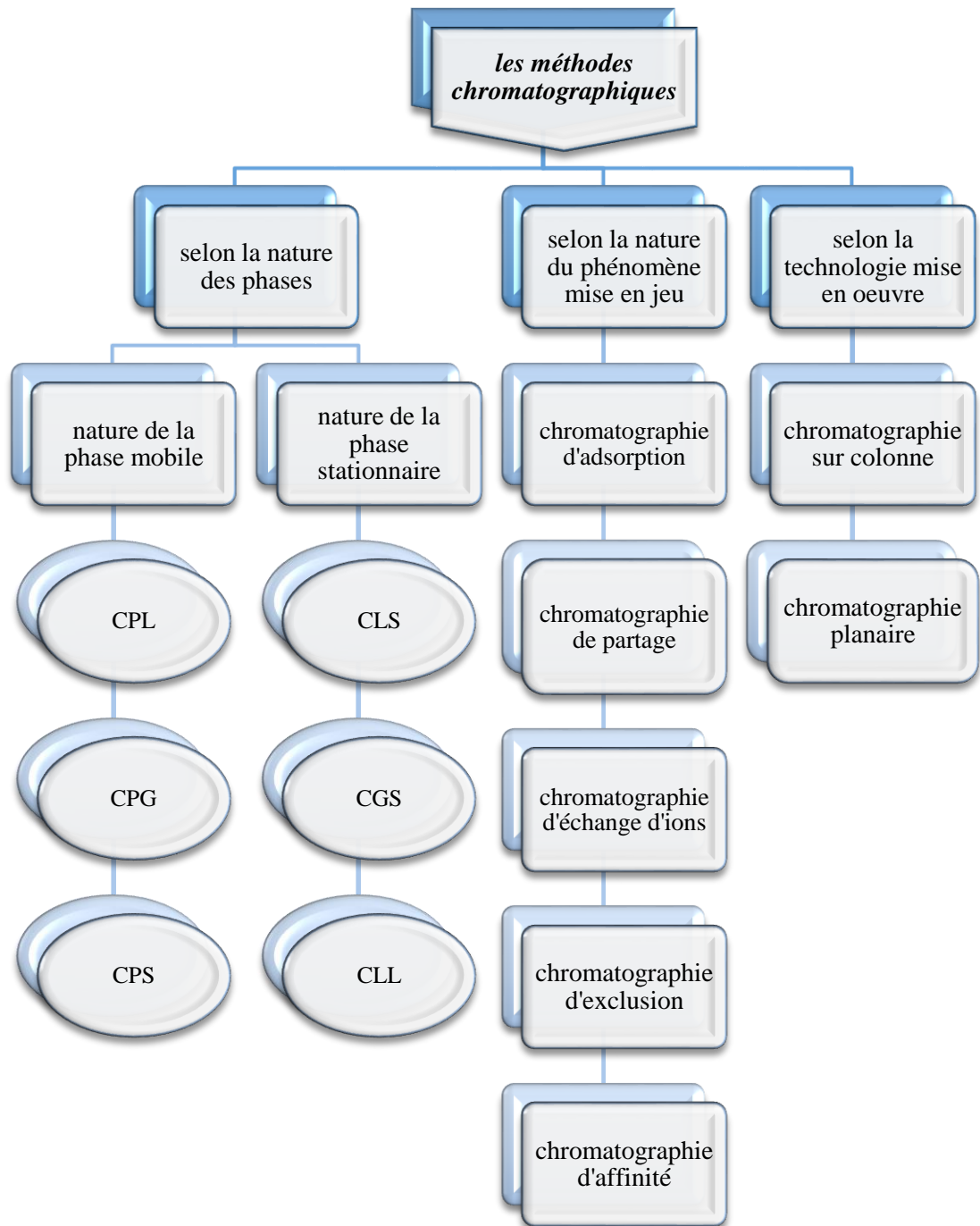


Schéma I.1. Classification des méthodes chromatographiques.

II.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La HPLC est connue comme étant la technique la plus utilisée parmi tous les procédés de séparations. En effet, elle est considérée comme une méthode idéale pour le dosage des formes pharmaceutiques et des fluides biologiques en raison de sa simplicité, sa haute spécificité et son large intervalle de sensibilité.

II.3.1. Définition

La HPLC (le terme à haute pression également utiliser) est souvent appelée du nom de son abréviation « CLHP /HPLC » « **high performance liquid chromatography** » en anglais.

Cette chromatographie est une technique de séparation analytique permettant l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un produit ou un mélange de produits. Ainsi, sa grande précision permet la recherche de traces infimes de substances présentes dans un mélange donné.^{10, 11}

II.3.2. Historique

C'est en 1958 que fut le début de la chromatographie en phase liquide moderne avec l'introduction de l'analyse « automatique » des acides aminés. Avant cette période, la chromatographie en phase liquide sur colonne (CPL), bien qu'étant la plus ancienne des méthodes chromatographiques a été relativement peu utilisée, en raison principalement, de sa lenteur et de l'absence de détecteurs.^{10, 12, 13}

Ainsi, la chromatographie en phase liquide sous haute pression a émergé après les fructueux travaux du docteur Giddings sur la hauteur équivalente à un plateau théorique. Il a démontré l'influence bénéfique de la haute pression et du diamètre des particules sur la résolution et la vitesse d'analyse. De ce fait, il a œuvré pour le développement de cette technique (cf. à son ouvrage *Dynamics of chromatography*), jusqu'à ce que Michael SCOTT ait obtenu de très bonnes résolutions en séparant plusieurs centaines de composés différents par échange d'ions sous haute pression.¹³

Cependant, ce n'est véritablement qu'en 1969, après le 5^{ème} Symposium International « Advance in Chromatography », que la chromatographie en phase liquide sous haute pression s'est véritablement développée. En effet, c'est grâce à ce nouveau procédé, ainsi qu'aux nouvelles technologies, notamment le traitement par ordinateur, que la CPL sur colonne a atteint et dépassé l'efficacité de la CPG.¹⁰ Ainsi, Cette chromatographie en phase liquide sous haute pression, ou haute performance (HPLC) est devenue l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques.

II.3.3. Principe

¹⁰ J.L. Cuq, **2001**.Cours chromatographie liquide. Université Montpellier.

¹¹ D. Skoogs, T.A. Nieman, F.J Holler, *Principes d'analyses Instrumentales.*, Ed. ; De Boeck Inc : Bruxelles, **2003** ; pp 725. Ch.28

¹² D. Skoogs, A.D. West, M. Holler, J. Crouch, *Chimie Analytique.*,3^e Ed. ; De Boeck Inc : Bruxelles,**2015** ; pp912. Ch.33.

¹³ R. Rosset, M. Caude, A. Jardy. *Chromatographies en phase liquide et supercritique.*, Ed : MASSON Inc : Paris ,**1991** ; pp1. Ch.1.

Préalablement, l'échantillon à analyser est injecté dans un flux de \emptyset_m liquide, appelée aussi éluant, qui lui amène vers la \emptyset_s se situant dans la colonne chromatographique lieu de la séparation et des interactions. Ainsi, ce flux de \emptyset_m est dû grâce à une pompe sous haute pression qui fait parcourir l'éluant le long du système chromatographique.

Etant donné que la HPLC est une méthode basée sur des différences d'interactions et affinités entre l'échantillon, \emptyset_m et la \emptyset_s , on constate un niveau de séparation bien déterminé puisque les différents composés constituant l'échantillon se répartissent, suivant leurs affinités, entre la \emptyset_m et \emptyset_s .

Ainsi, la théorie de la séparation montre que le signal enregistré à la sortie d'un détecteur approprié se présente sous forme d'un pic et l'ensemble des pics enregistrés, qui correspondent aux différents composés, est appelé chromatogramme.¹⁴

II.3.4. Appareillage

L'installation de la HPLC nécessite un assemblage d'organes bien spécifiques afin d'avoir une bonne séparation des constituants.^{15, 16} En effet, elle est constituée principalement d'un réservoir de la phase mobile, d'une pompe, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique, d'un détecteur et d'un intégrateur (figure I.3).

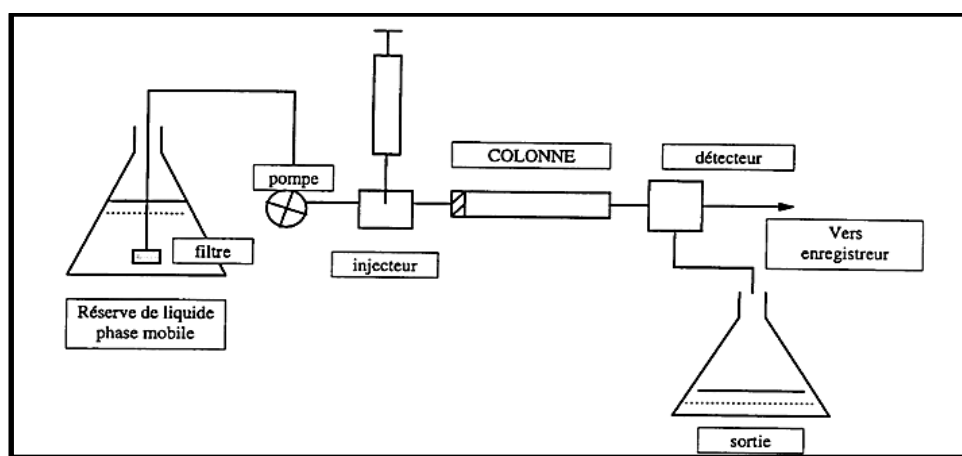


Figure I.3. Instrumentation fonctionnelle de la HPLC

✚ **Le réservoir de la phase mobile :** en générale, le réservoir est une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante le plus souvent en téflon. S'il est

¹⁴ D. Fung ho, B. Stuart, E.R. Prichard, High Performance Liquid Chromatography., Ed. ; LGC Inc :UK,2003, pp1-2.

¹⁵ S. Lindsay, High performance liquid chromatography., Ed. ; BEHALF of Acol. Wiley Inc : London, 1987,pp 287.

¹⁶ A.V. Kostarnoi, G.B. Golubitskii, E.M. Basova, E.V. Budku, V.M. Ivanov, J. Anal.Chem.2008, 63, 516.

nécessaire, le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphères d'hélium.¹⁷

✚ **La pompe** : c'est la partie qui sert à faire circuler, sous pression, le mélange de l'échantillon et la Øm le long du système chromatographique. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, la stabilité du flux et le mode d'éluion (isocratique ou par gradient) (Figure I.4).¹⁸

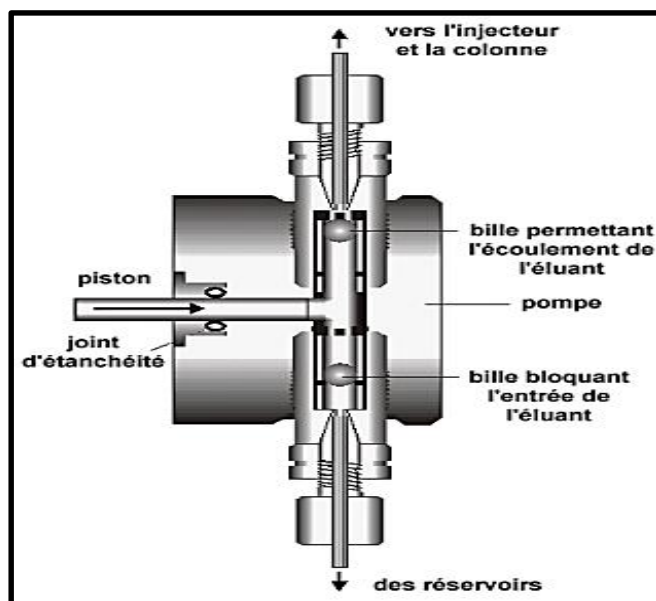


Figure I.4. Fonctionnement du système de pompage en HPLC

✚ **L'injecteur** : il est constitué généralement d'acier inoxydable ou de téflon et comporte couramment une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10,20 et 50 micro litre) et le remplissage se fait grâce à une seringue. Ainsi, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. La vanne à boucle d'échantillonnage possède 2 positions : à gauche illustre le remplissage de la boucle d'injection de volume tandis qu'à droite est la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (Figure I.5).¹⁹

¹⁷ H. Eengelhardt, High performance liquid chromatography : Chemical laboratory practice., Ed. ; Springer Verlag Inc : USA, 1979, pp33. Ch.3.

¹⁸ P. Gareil. Thèse de doctorat. Université pierre marie curie, Paris.1981.

¹⁹ B.L. Reuhs, M.A. Rounds, High-Performance Liquid Chromatography., 2010, pp502-503. Ch.28.

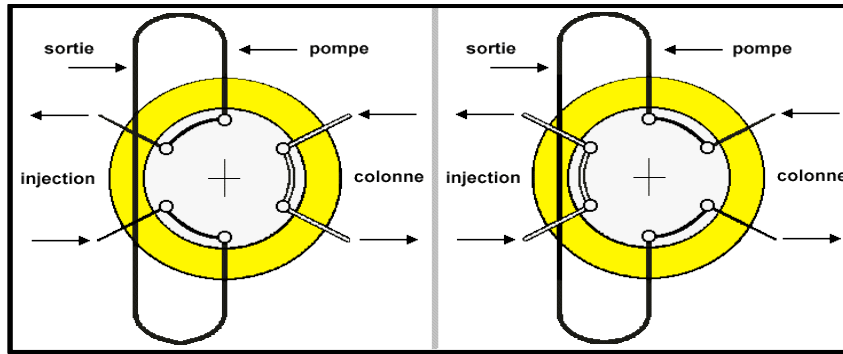


Figure I.5. Fonctionnement de l'injecteur à boucle

✚ **La colonne chromatographique :** c'est le cœur même de la HPLC car elle est le lieu de séparation des composés à analyser. La colonne est un tube en inox rempli de silice, de silice greffée ou particules polymériques (à une granulométrie de $3\mu\text{m}$, $5\mu\text{m}$ ou $10\mu\text{m}$) ou même par un autre liquide en cas de séparation par chromatographie de partage (figure I.6).²⁰

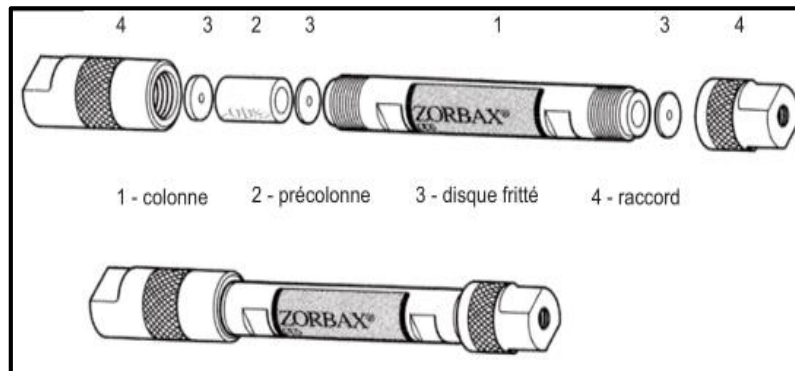


Figure I.6. Différents compartiments de la colonne.

✚ **Le détecteur :** A la sortie de la colonne, le flux rencontre le détecteur qui suit et détecte l'apparition successive des différents composés séparés et ce grâce à des phénomènes physico-chimiques différents selon le type de détecteur. Également, le détecteur utilisé couramment en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV permettant d'avoir un signal électrique de sortie qui est une tension continue qui varie entre 0 et 1 volt.²¹

Par ailleurs, il existe d'autres types de détecteurs à l'exemple des détecteurs à indice de réfraction, détecteurs de type Spectromètre de masse (MS), détecteur électrochimique (DEC),

²⁰ J. Mendham. R.C. Denney. J.D. Barnes. M.J.K. Thomas, Analyse chimique quantitative de Vogel., Ed. ; De Boeck, **2005**, pp36.

²¹ P.C. Sadek, Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography., Ed. ; Wiley, Inc : USA, **2004**, pp 45.

UV à barrette de diodes et fluorimétrie... ainsi que différents types de couplage tels que la spectrométrie infrarouge, spectrométrie de masse, Résonance Magnétique Nucléaire...

✚ **L'intégrateur** : afin d'effectuer des analyses exactes permettant d'avoir le dosage le plus précis des différents échantillons, il faut chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer.²²

II.3.5. Grandeurs caractéristiques

Les résultats observables d'une analyse par HPLC sont sous forme d'un chromatogramme qui se présente sous la forme d'une courbe du signal détecté en fonction du temps. En effet, le chromatogramme se présente comme une séquence de pics de formes gaussiennes dans laquelle plusieurs grandeurs caractéristiques sont définies à partir de ces derniers (tableau I.2).²³

Tableau I.2. Grandeurs caractéristiques

Grandeur	Définition	Formule
Temps de rétention (t_r)	Le temps que met le soluté à sortir de la colonne, donc le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué.	
Temps mort (t_m)	Le temps correspondant à un composé non retenu pendant l'analyse chromatographique.	

²² K. Hamza, A. Touati, A. Ait Yahia, A. Makla, Sci. Technol., **2008**, 28, 65.

²³ Z. Hemriti, Validation du procédé de nettoyage d'un produit pharmaceutique., Ed : Universitaire européenne, **2015** ; pp32-34. Ch.1.

<p>Largeur du pic (ω)</p>	<p>La mesure de cette grandeur peut se faire par l'intersection des tangentes du pic à ses points d'inflexions avec la ligne de base.</p>	<p>Figure I.7 : Chromatogramme présentant le t_m, t_r et les ω</p>
<p>Facteur de rétention du pic (k')</p>	<p>Permet d'appréhender la capacité de la colonne à retenir le composé dans les conditions d'éluion paramétrées.²⁴ $k' \leq 1 \rightarrow$ Elution trop rapide $1 < k' < 5 \rightarrow$ Elution optimale $k' \geq 5 \rightarrow$ Elution trop lente</p>	$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$
<p>Sélectivité (α)</p>	<p>La mesure de la capacité de la colonne à séparer les maximas des deux pics. Plus elle est supérieure à 1 plus les temps de rétention sont éloignés.</p>	$\alpha = \frac{k'2}{k'1}$
<p>L'efficacité N/ nombre de plateaux théoriques (Nth)</p>	<p>Elle se traduit par la finesse des pics obtenus par les composés. Plus le pic est fin plus la colonne est efficace. Elle s'exprime par deux grandeurs « Nth » et « H »</p> <ul style="list-style-type: none"> Nth correspond au nombre d'équilibres successifs que subit un composant du mélange.²⁵ 	$N = 16 \cdot \frac{(t_r)^2}{(\omega)^2} = 5.54 \cdot \left(\frac{(t_r)^2}{(\omega)^{1/2}} \right)^2$
	<ul style="list-style-type: none"> La hauteur équivalente à un plateau théorique « HEPT » ou bien « H » afin de comparer des colonnes de longueurs différentes. 	$H = \frac{L}{N}$
<p>Résolution (R_s)</p>	<p>La mesure de la qualité de séparation entre deux pics. $R_s \leq 1 \rightarrow$ mauvaise résolution (chevauchement des pics)</p>	$R_s = 2 \cdot \frac{t_r2 - t_r1}{\omega1 + \omega2}$
	<p>$R_s = 1 \rightarrow$ Il y'a 2% de recouvrement des composés.</p>	

²⁴ Y. Tsulti, W. Morozowiche, Chromatographie science GCL and HPLC determination of agents., 2003, 9, 18.

²⁵ Olivier Vigneau. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon.2002.

	<p>$R_s \geq 1.5 \rightarrow$ Bonne séparation.</p> <p>En réalité, la résolution est une fonction des 3 caractéristiques : efficacité, sélectivité et facteur de rétention.</p>	$R_{s1,2} = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{k'2}{1+k'2}$
--	--	---

II.3.6. Analyse d'un chromatogramme

Un chromatogramme réel, comporte différents paramètres que l'on cherche à modéliser. Ces principaux paramètres sont illustrés dans la figure I.8.

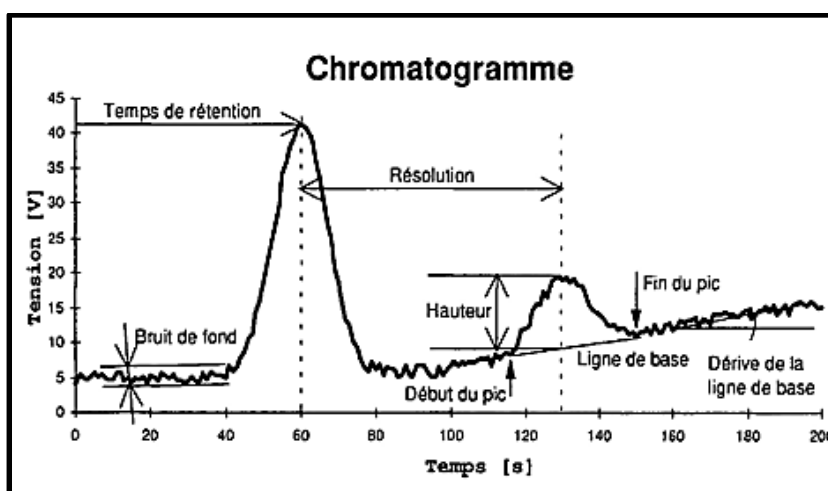


Figure I.8. Différents paramètres modélisables pour un chromatogramme.

Le chromatogramme se compose de trois éléments : la ligne de base, le bruit de fond et les pics.²⁶ Il est dit correct si celui-ci présente une allure de pics de forme symétrique, pas trop larges et bien séparés. Ainsi, c'est en jouant sur les conditions opératoires de chaque pic que l'on arrive à ce dernier. De plus, il est primordial de déterminer sa résolution par rapport au pic précédent et au pic suivant, son temps de rétention, ses temps de départ et de fin, sa hauteur et sa surface.²⁷

Dans la figure I.9 est décrit un exemple de l'allure d'un pic asymétrique (mauvais chromatogramme).

²⁶ O. Naef, Chimia, **1994**, 26, 409.

²⁷ F. Goudriaan, D. Peferoen, Chem. Eng. Sci. **1990**, 45, 2729.

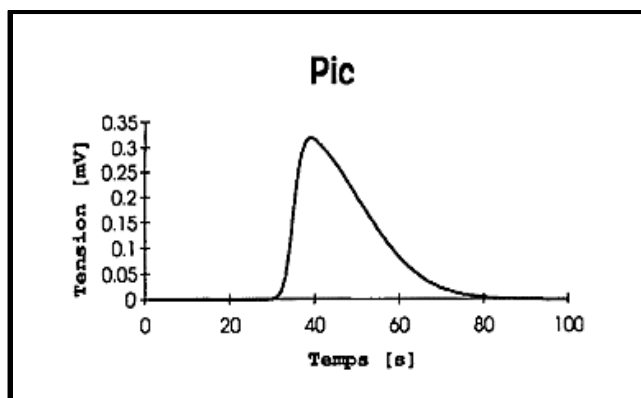


Figure I.9. Exemple d'un pic asymétrique.

II.3.7. Domaines d'application de la 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 ou les sciences.

II.3.7.1. L'agroalimentaire

La HPLC est principalement utilisée dans le contrôle de la qualité et la sécurité alimentaire, le contrôle des contaminations et les additifs dans une matrice alimentaire. De ce fait, son utilisation s'est avérée dans l'analyse qualitative et quantitative des éléments dans les aliments telle que l'analyse des sucres, des acides aminés et des vitamines.²⁸

II.3.7.2. La cosmétologie

La HPLC se révèle être une technique bien adaptée aux analyses réalisées par les laboratoires de cosmétologie plus précisément sur des substances peu ou pas volatiles et parfois thermolabiles ou polaires.²⁹ De plus, son utilisation s'est distinguée dans la recherche des substances bioactives et l'identification des parabènes suspectés d'être à l'origine des cancers...³⁰

II.3.7.3. L'environnement

La HPLC est parmi les méthodes les plus employées pour l'analyse et la surveillance environnementale et cela grâce à sa grande efficacité dans l'identification des contaminants

²⁸ B. Zywicki, G. Catchpole J. Draper, O. Fiehn, *Anal. Biochem.*, **2005**, 336, 78.

²⁹ Soutour Sylvain. Thèse de doctorat. Université de Corse pascal paoli. **2010**.

³⁰ T. Doi, K. Kajimura, S. Takatori, N. Fukiri, S. TAGUSHI, S. Iwagani, *J. Chromatogr. B.*, **2009**, 877,1005.

inconnus dus à la dégradation ou aux processus de transformation, comme l'identification des composés extraits des plantes, analyse des contaminants dans les eaux résiduaires...³¹

II.3.7.4. Pharmaceutique

La HPLC revêt une utilité dans l'industrie de la fabrication de produits pharmaceutiques et des médicaments, car elle permet à la fois une analyse qualitative et quantitative. En effet, elle est utilisée généralement dans le but d'assurer la production correcte des médicaments, et ainsi la vérification de la pureté de ces derniers.³²

De plus, son utilisation s'est distinguée dans l'identification et dosage de quelques principes actifs (PA) et excipients ainsi que le contrôle des impuretés, la matière et la stabilité des médicaments.³³

Aussi, et parmi ces innombrables utilisation dans le domaine pharmaceutique, il a été décrit que la capacité de prouver la pureté des molécules énantiomériques, utilisant des phases stationnaires chirales (CSPs), est une norme dans les analyses pharmaceutiques, pour lesquelles la HPLC convient.³⁴

³¹ MJ. Farré, S. Brosillon, X. Domènech, J. Peral, J. Photochem. Photobiol., **2007**, 189, 364.

³² F. Bailey, J. Chromatography.,**1976**, 122, 73.

³³ F. Rouessac, A. Rouessac, Analyse chimique, méthodes et technique instrumentales modernes., Ed. ; MASSON, Inc : Paris, **1992**, pp55.

³⁴ A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi. Anal Chim Acta. **2011**,706, 205.

Chapitre II

*Mise en point d'une méthode
d'analyse chromatographique*

Dans l'analyse chromatographique, la séparation obtenue après des essais préliminaires n'est pas toujours satisfaisante. Ainsi, lorsque la résolution est insuffisante, le temps d'analyse trop long, ou l'efficacité de la colonne n'est pas satisfaisante, les conditions expérimentales doivent être modifiées. Tout changement majeur effectué doit impérativement être suivi d'une validation analytique, dans le but de démontrer que la méthode est valide et le restera dans le temps.

I. OPTIMISATION DES CONDITIONS OPERATOIRES D'UNE METHODE CHROMATOGRAPHIQUE

I.1. Paramètres liés à l'optimisation

Une amélioration des paramètres opératoires d'une HPLC peut être envisagée si la séparation obtenue n'est pas convenable. De ce fait, l'optimisation consiste à agir sur différents paramètres liés soit à la colonne, la phase stationnaire (\emptyset_s) ou la phase mobile (\emptyset_m). Il est important de noter que pour chaque changement effectué, il est impératif de s'assurer que tous les paramètres restent toujours conformes.

I.1.1. Augmentation de l'efficacité d'une colonne

La largeur d'un pic et son asymétrie est caractéristique de l'efficacité de la séparation. Ainsi, plus le pic est fin, plus la technique chromatographique est efficace, de ce fait, l'efficacité de la colonne (N) est mesurée à l'aide de la relation : $N = L/H$ ³⁵

Où L = longueur de la colonne

H = hauteur de plateau théorique

Par conséquent, N d'une colonne augmente lorsque le nombre de plateaux théorique (Nth) augmente ou si H diminue à longueur (L) constante.³⁵

I.1.1.1. Augmentation du nombre de plateau théorique

L'augmentation du nombre de plateau théorique revient à rétrécir le pic à la base, c'est-à-dire, diminuer la largeur du pic (ω) et donc diminuer le facteur d'asymétrie (A_s) selon l'équation :³⁶ $N = 16 (t_r / \omega)^2$

Où t_r : Temps de rétention

³⁵ Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition, Tome I, 2017.

³⁶ A. Pryde, M.T. Gilbert, Application of high performance liquid chromatography, Ed :Johns wiley and sons, 1979 ; pp6-8.

I.1.1.2. Diminution de la hauteur équivalente à un plateau théorique

La diminution de la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), dans ce cas, dépend des trois facteurs cités ci-dessous.

- **Diminution du diamètre des particules (d_p) de la phase stationnaire**

Au voisinage de la vitesse réduite optimale (V_{opt}), la hauteur est minimale (h_{min}) se traduit par l'expression suivante³⁶ : **HEPT = $h_{min} \cdot d_p$**

Cette expression montre que la diminution de la taille des particules est accompagnée d'une diminution de HEPT, donc d'une augmentation de N de la colonne, une diminution du facteur d'asymétrie et la largeur du pic chromatographique.^{37 38}

Comme illustrer sur la figure II.1, plus la taille des particules remplissant la \emptyset s augmente, plus N de la colonne est réduit.

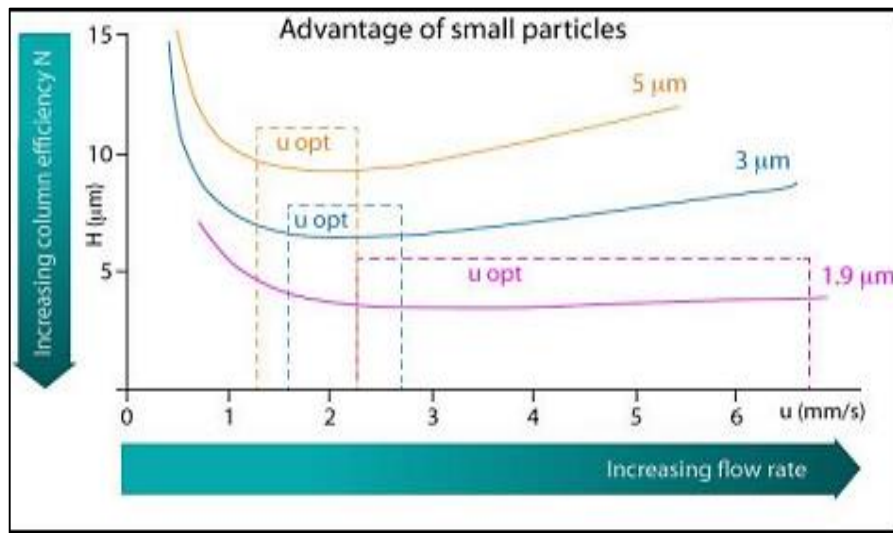


Figure II.1. Effet du diamètre des particules remplissant la phase stationnaire sur N.

La diminution de la hauteur équivalente à un plateau théorique dépend également de la :

- **Diminution du diamètre de la colonne**
- **Minimisation de l'épaisseur du film liquide**⁷

I.1.1.3. Inconvénients de l'augmentation de l'efficacité d'une colonne

L'augmentation de l'efficacité d'une colonne chromatographique peut présenter des inconvénients parmi lesquels :⁷

³⁷ S. Ahuja, Selectivity and delectability Optimization in HPLC, Ed.: John Wiley, **1989**; pp 8. Ch.1.
³⁸ S. Ahuja, H. Rasmussen, HPLC Method development for pharmaceuticals, Ed.; UK: Academy Press, **2007**; pp18.

- **Augmentation du temps d'analyse (t_r) :**

Donnée selon l'équation suivante : $t_r = \omega \frac{1}{4\sqrt{N}}$ où ω représente la largeur du pic.

- **Augmentation de la perte de charge (ΔP) :**

Exprimée avec l'équation : $\Delta P = \Phi L \cdot V/d$ où ΦL est le facteur de résistance à l'écoulement.

I.1.2 Augmentation de la vitesse de la phase mobile

La vitesse d'écoulement (V) de la \emptyset_m peut être également augmentée, impliquant de ce fait, la modification du débit. Ainsi, cette dernière se traduit par la diminution du temps d'analyse. Cependant, elle présente deux inconvénients :⁷

- L'augmentation de la perte de charge.
- La perte de N de la colonne.

La figure II.2 représente la courbe de Van Deemter qui montre que N d'une colonne est directement liée au débit de la \emptyset_m .

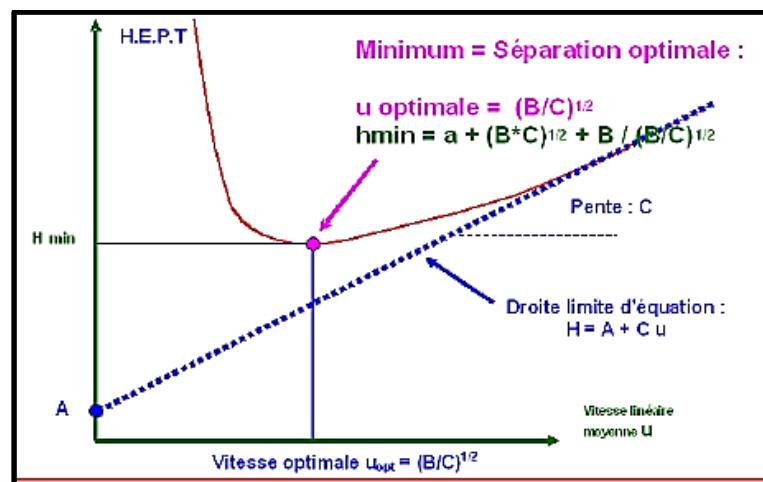


Figure II.2. Courbe de Van Deemter

I.2. Paramètre les plus sensibles permettant une meilleure optimisation de la méthode d'analyse

L'efficacité d'une colonne et l'élargissement des pics peuvent être améliorées en optimisant un certain nombre de paramètres.

⁷ G. Burgot, J.L. Burgot, Chimie analytique, Ed. ; Tec & doc Lavoisier Inc : Paris, 2017 : pp 281.

I.2.1. Modification du pH de la phase mobile

Il est important de contrôler le pH de la \emptyset_m car celui-ci a une forte influence sur la balance hydrophile/hydrophobe. De plus, le pH de la \emptyset_m influe sur la forme prédominante de la molécule à analyser ayant un caractère acido-basique.³⁷

Par ailleurs, lorsque le composé est ionisable, il est nécessaire de tamponner les solutions afin de fixer les proportions de chacune des formes en équilibre (forme libre/forme ionisée) d'où l'intérêt du tampon. Aussi, il est important de citer que dans un milieu exempt du tampon, une petite variation du pH peut être à l'origine d'une énorme variation dans la rétention et dans la séparation chromatographique du composé.³⁹

I.2.2. Modification de la polarité de la phase mobile

L'exploitation du phénomène de rétention en chromatographie ainsi que la polarité de l'éluant a une influence considérable sur la vitesse de déplacement des composés d'un mélange. Ainsi, plus l'éluant est polaire plus les composés se déplacent rapidement. En effet, l'éluant est également adsorbé sur les sites actifs de la \emptyset_s et entre en compétition avec les composés du mélange.⁴⁰

Par ailleurs, et afin d'ajuster la force de l'élution de la \emptyset_m , il est possible d'utiliser un solvant pur ou mélanger plusieurs solvants miscibles en fonction des solutés à séparer. La figure II.3 présente la table de miscibilité des solvants en HPLC permettant de choisir entre les divers solvants pour que l'éluant puisse entraîner les solutés.⁴¹

³⁷ S. Ahuja, Selectivity and delectability Optimization in HPLC, Ed.: John Wiley, **1989**; pp 120.

³⁹ O'Neill, Mj, The Merck Index une encyclopédie des produits chimiques, des médicaments et des produits biologiques, 13e éditions, Whitehorse stations NJ. Mec ad Co, Inc., **2001**

⁴⁰ Brière Thierry, Cours Simulateur de chromatogrammes avec effet de solvant, Université de la Réunion.**2001**.

⁴¹ G. Drut Grevoz, A. Laubriet, Reconnaissance et Préparation de Médicaments à l'officine, Ed, ; Maloine, **2007**, pp 245.

		TABLE DE MISCIBILITE DES SOLVANTS																
		Miscible							Non-miscible									
acide acétique																		
acétone																		
acétonitrile																		
benzène																		
n-butanol																		
chloroforme																		
cyclohexane																		
dichlorométhane																		
DMSO																		
eau																		
éthanol																		
éthyle acétate																		
éther éthylique																		
hexane																		
iso-octane																		
méthanol																		
2-propanol																		
		acide acétique	acétone	acétonitrile	benzène	n-butanol	chloroforme	cyclohexane	dichlorométhane	DMSO	eau	éthanol	éther éthylique	éthyle acétate	hexane	iso-octane	méthanol	2-propanol

Figure II.3. Table de miscibilité des solvants en Chromatographie liquide haute performance

1.2.3. Optimisation de la température

En pratique, la manipulation avec une haute température rend la séparation très facile tout en favorisant la diffusion des solutés dans les deux phases. Ainsi, il en résulte une augmentation des vitesses de transfert entre la \emptyset_s et la \emptyset_m , de ce fait, l'augmentation de la résolution et raccourcissement du temps d'analyse.⁴²

1.2.4. Limite de la pression

Les colonnes HPLC (support silice) sont remplies sous très haute pression (500-800 bars). Néanmoins, il est préconisé d'éviter l'utilisation des colonnes à une pression continue supérieure à 3500psi (250bars). En effet, faire l'analyse à des pressions élevées limite la durée de vie de la colonne et engendre une détérioration prématurée des joints haute pression de la pompe HPLC. De ce fait, il est donc nécessaire de trouver un compromis : une pression acceptable et une efficacité de la colonne (N) élevée.⁴²

⁴² Anne-Marie Servais, Thèse de doctorat, Université de Liège, 2005.

II. TEST DE CONFORMITE DU SYSTEME CHROMATOGRAPHIQUE (SYSTEM SUITABILITY TEST)

Le test de conformité du système chromatographique constitue l'une des parties les plus importantes dans l'analyse. En effet, l'objectif principal de ce test est de s'assurer de la performance du système utilisé pour l'analyse, également, de montrer que le système de mesure est satisfaisant au moment de l'analyse.

II.1. Définition

Conformément à l'USP, les tests de conformité du système (en anglais, Système Suitability tests) font partie intégrante des méthodes chromatographiques gazeuses et liquides. En effet, ils visent à vérifier la performance du système chromatographique par la vérification de quelques paramètres.⁴³

II.2. Paramètres de vérification pour l'évaluation d'un système chromatographique

Le système utilisé dans une analyse doit satisfaire aux critères de conformité pendant toute la procédure chromatographique. Les paramètres regroupés dans le tableau II.1 présentent les normes soient fixées dans la procédure interne du laboratoire ou dans les référentiels tels que : United States Pharmacopiea (USP).⁴⁴

Tableau II.1. Paramètres de vérification pour l'évaluation d'un système chromatographique selon l'USP

Paramètres	Descriptions	Critères d'acceptation
Nombre de plateaux théoriques (Nth)	Mesure l'efficacité de la séparation	> 2000
Facteur de symétrie (As)	Mesure de la symétrie d'un pic	< 2,0
Coefficient de variation (CV)	Mesure la reproductibilité du système durant l'analyse chromatographique	≤ 2,0%
Recouvrement (R%)	Mesure de la précision entre deux préparations standards	[98,0 – 102,0] %

⁴³ United States Pharmacopiea USP. <1058>.

⁴⁴ J. Cazes, Ewing's Analytical Instrumentation Handbook, Ed.; Marcel Dekker, **2004**; pp1019. Ch.31.

III. VALIDATION D'UNE METHODE CHROMATOGRAPHIQUE

Le cycle de vie d'une méthode analytique passe par plusieurs étapes caractérisant son évolution au sein des laboratoires. En pratique courante, après la mise au point complète de la méthode, il vient l'étape de validation afin qu'elle soit utilisée en routine avec une revue périodique pouvant aboutir à une revalidation ou un ajustement de(s) paramètre(s) dans le but d'élaborer un nouveau cycle de vie.

III.1. Définition

Dans l'industrie pharmaceutique, la validation est une opération destinée à démontrer que tout procédé utilisé pour l'analyse d'un produit conduit effectivement au bon résultat.

D'autre part, selon la BPF (les bonnes pratiques de fabrication), « *la validation est une opération destinée à démontrer que tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système conduisant aux résultats attendus* ». ⁴⁵

Ainsi, quatre types de méthodes d'analyse font l'objet d'une validation périodique : ⁴⁶

- Test d'identification.
- Dosage quantitatif des impuretés.
- Vérification des teneurs limitées.
- Dosage du principe actif (PA) ou de plusieurs autres composantes de la substance médicamenteuse ou du produit fini (PF).

III.2. Objectifs de la validation analytique

Le but de la validation analytique est de démontrer, d'une part, qu'une procédure d'analyse correspond à l'usage pour lequel elle est prévue avec une exactitude et une précision adéquate, et d'autre part, de démontrer la conformité du résultat (contrôle de la matière première, article de conditionnement et les produits finis). ²³

⁴⁵ Comité OMS d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques, validation des méthodes d'analyse des produits pharmaceutiques, pharmacopée internationale et activités connexes, 32^e rapport, Genève, **1992**, pp 5.

⁴⁶ H. Boudis. Validation analytique. Publication. Mai **2011**.

²³ Z. Hemriti, Validation du procédé de nettoyage d'un produit pharmaceutique. Ed : Universitaire européenne, **2015** ; pp11.

Ainsi, l'objectif principal de la validation n'est pas de comparer une méthode à une autre préexistante (méthode de référence) mais de mieux connaître ses caractéristiques.

III.3. Critères de validation

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. En effet, la validation est couramment utilisée dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus.

Les principaux critères de performances sur lesquels porte la validation sont résumés dans le schéma II.1.

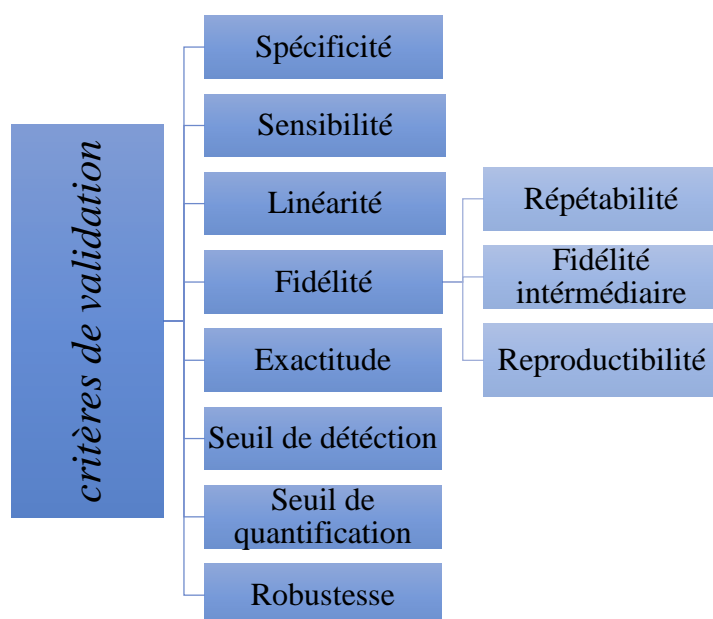


Schéma II.1. Critères de la validation

III.3.1. Spécificité

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, ... etc. ⁴⁷

III.3.2. Sensibilité

Il s'agit de l'aptitude d'une méthode d'analyse à enregistrer de faibles variations de la concentration. En effet, elle représente la variation minimale qu'il faut imposer à la grandeur

⁴⁷ ICH Guide ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytique procédure Text and Methodology Q2. (R1) November 2005.

mesurer x (par exemple la concentration) pour obtenir une variation significative du signal mesuré y . Ainsi, dans le cas d'une méthode donnant une réponse linéaire la sensibilité est mesurée par la pente de la courbe d'étalonnage.⁴⁸

III.3.3. Fidélité

La fidélité de la procédure d'analyse exprime le degré de dispersion entre l'une des mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Ainsi, la fidélité est représentée par :

- *La répétabilité :*

La répétabilité ou appelée *fidélité intrinsèque*, exprime la fidélité sous condition identique c'est-à-dire le même analyste utilisant le même équipement avec le même réactif dans le même laboratoire.⁴⁹

- *La fidélité intermédiaire :*

Les variations étudiées sont en générale un changement du jour, ensuite il est recommandé de changer d'analyste, d'équipement et de réactifs.⁵⁰

- *La reproductibilité :*

Les conditions ou les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans divers laboratoires, avec différents opérateurs en utilisant des équipements différents.⁴⁹

III.3.4. Linéarité

La linéarité d'une méthode d'analyse est la capacité de cette méthode à donner des résultats, qui sont à l'intérieur de certaines limites, directement proportionnels à la concentration de la substance analysée dans un échantillon. Ainsi, la linéarité s'exprime par le coefficient de corrélation de la droite de régression (R^2) obtenue qui doit être $>$ à 0.995, par le

⁴⁸ Document de la validation des méthodes d'analyse, groupe SAIDAL FILIALE BIOTIC (Adopté : Aout **1989**).

⁴⁹ S. Ahuja, S. Scypinski, Handbook of Modern Pharmaceuticals Analysis, separation science and technology. Ed : Academie Press. **2001** ; pp434.

⁵⁰ Isabelle Pinguet. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux. **2015**.

point d'interception sur l'axe des y (ordonnée à l'origine) et ainsi que la pente de la droite de régression.⁵¹

III.3.5. Exactitude

L'exactitude est l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir de larges séries d'essais et une valeur de référence acceptée. En effet, l'étroitesse de l'accord observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, en d'autres termes, il s'agit de l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, sa détermination ne nécessite pas de manipulation, les données sont issues de la fidélité et de la justesse.⁴⁷

III.3.6. Seuil de détection

Le seuil de détection est arbitrairement défini comme la plus petite concentration ou quantité de substance analysée pouvant être distinguée de la valeur du blanc avec un intervalle de confiance fixé.⁵²

III.3.7 Seuil de quantification

La limite de quantification constitue la plus petite quantité d'une substance à examiner pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définie.⁵²

III.3.8. Robustesse

La robustesse est la mesure de la dispersion d'un résultat lorsque des variations contrôlées et limitées de part et d'autre dans des conditions opératoires normales qui sont imposées. Ainsi, ces variations peuvent être des déviations analytiques, aléatoires ou introduites de manière fortuite par l'analyste. D'autre part, la robustesse est d'autant plus élevée que le résultat de l'analyse dépend moins de ses variations aléatoires. Par conséquent, elle doit être évaluée par rapport à la fidélité afin de séparer clairement les tests de robustesse et de reproductibilité.⁵³

⁵¹ M. Feinberg, Labo-stat : Guide de validation des méthodes d'analyses, Ed : Lavoisier Inc : Paris. **2009** ; pp54-55.

⁴⁷ ICH Guide ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytique procédure Text and Methodology Q2.(R1)November **2005**.

⁵² M.E. Swartz, I.S. Krull, Analytical method development and validation, Ed : CRC,**1997** ; pp61-62.

⁵³ Programme des produits thérapeutiques. Ottawa 12 février **1999**.

CHAPITRE II. MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

Au terme de cette partie théorique, il est important de noter que l'optimisation des conditions opératoire de la méthode HPLC améliore grandement ses performances. Cependant toute modification faite doit s'inscrire dans les normes fixées dans l'ajustement des conditions chromatographiques selon USP et Ph.Eur. Dans le cas contraire une revalidation s'imposerait.

Chapitre III

*Méthodologie, résultats et
discussions*

PRESENTATION DU SITE DU STAGE

Les laboratoires **BEKER®** ont été créés en 2004 par l'émergence du premier site à Dar El Beida, Alger. Une entité de droit algérien répondant à la volonté politique du gouvernement Algérien qui s'est fixé pour priorité la production locale de produits pharmaceutiques afin de réduire les dépenses de santé, en assurant la disponibilité de médicaments de qualité pour tous.

Actuellement, les laboratoires BEKER sont spécialisés dans le développement, fabrication et commercialisation de produits pharmaceutiques génériques de qualité sous forme sèches (comprimés, gélules et poudres) de classes thérapeutiques diverses.

Dans le présent chapitre sera décrite la méthodologie ainsi que les résultats obtenus à l'issu du dosage d'un médicament antibiotique AZITHROMYCINE® 500mg en comprimé enrobé par la HPLC en utilisant/variant les paramètres d'un protocole expérimental préalablement établi dans le dossier technique du produit, un matériel et des critères de conformité prédéfinis.

I. OPTIMISATION DES PARAMETRES OPERATOIRES DE LA HPLC

L'optimisation de la méthode d'analyse ou du dosage de d'AZITHROMYCINE par HPLC consiste à effectuer un ensemble de changements sur les divers paramètres chromatographiques, suivi d'une validation de celle-ci selon les critères décrits par l'USP (United states pharmacopiea) ainsi que les recommandations de l'ICH (International Concil for harmonisation).

I.1. Matériels et produits chimiques

Le dosage chromatographique de l'AZITHROMYCINE a été réalisé avec des équipements qualifiés, calibrés et étiquetés. Quant à la verrerie utilisée pour le dosage est de qualité requise et les réactifs employés sont tous de grade HPLC.

I.1.1. Réactifs

Les solvants employés tels que l'acétonitrile, l'hydrogène phosphate de potassium et l'acide phosphorique pour le dosage de l'AZITHROMYCINE sont tous de haute pureté (99.9, 98 et (85-88) %) respectivement. En effet, la qualité de ces réactifs à une influence sur le succès du procédé analytique ainsi que sur la fiabilité des résultats obtenus.

I.1.2. Appareillages et verreries

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'une chaîne HPLC de marque Agilent 1100 couplée à un détecteur UV, également, équipée d'un injecteur automatique, guidé par un logiciel d'acquisition (Agilent Chemstation online/offline) (figure III.1).



Figure III.1. Dispositif de l'appareillage de la HPLC

La verrerie du laboratoire désigne divers équipements employés pour expériences scientifiques ou des procédures à petite échelle. En effet, la connaissance et le choix du matériels sont importants selon les bonnes pratiques du laboratoire (BPL) et considérés comme un prérequis pour l'obtention des résultats d'analyse fiables. Ainsi, dans le tableau III.1 sont mentionnés l'essentiel de la verrerie et du matériel utilisés pour la réalisation de cette étude.

Tableau III.1. Matériels et verreries utilisés

Caractères	
Verreries de précision	Fioles jaugées (100ml). Classe A
Equipements	Balance analytique de marque OHAUS Calibrée au préalable avant l'utilisation
	Bain ultrason de marque ISOLAB
	pH mètre de marque OHAUS

Autres	Seringue et filtre en nylon de 0.45µm
	Vials de 2ml de marque WATERS

I.2. Méthodes

La méthode utilisée afin de mettre au point un procédé de dosage de l'AZITHROMYCINE est la méthode RP-HPLC (à phase inverse) utilisant un régime isocratique avec un pH basique qui s'oppose à l'acidité de la molécule. Les conditions opératoires employées sont regroupées dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Conditions chromatographiques de la méthode de dosage par HPLC de l'AZITHROMYCINE dans les comprimés dosés à 500 mg.

Paramètres chromatographiques	Conditions chromatographiques
Phase mobile	Tampon phosphate pH= 7.5 / ACN (50/50)
Débit	1.0 ml/min
Longueur d'onde	215 nm
Volume d'injection	10µl
Température de la colonne	40C°
Solvant de dissolution	Phase mobile
Colonne chromatographique	Merck C18, 5µm (150mm x 4.6 mm)

La colonne chromatographique

La colonne utilisée est de type RP-HPLC de marque MERCK du type C18 (figure III.2). Cette dernière est exploitée pour la séparation d'échantillons basiques, neutres, chélateurs de métaux ou autre format. Aussi, employée pour le développement des méthodes robustes sur l'ensemble du spectre pH [1.5-10.5].



Figure III.2. Colonne MERCK.

I.2.1 Préparation des solutions

Les schémas III.1, III.2, III.3 résument les différentes étapes de la préparation de la \emptyset m, solution standard et placebo principalement employées dans cette étude.

- **Préparation de la phase mobile**

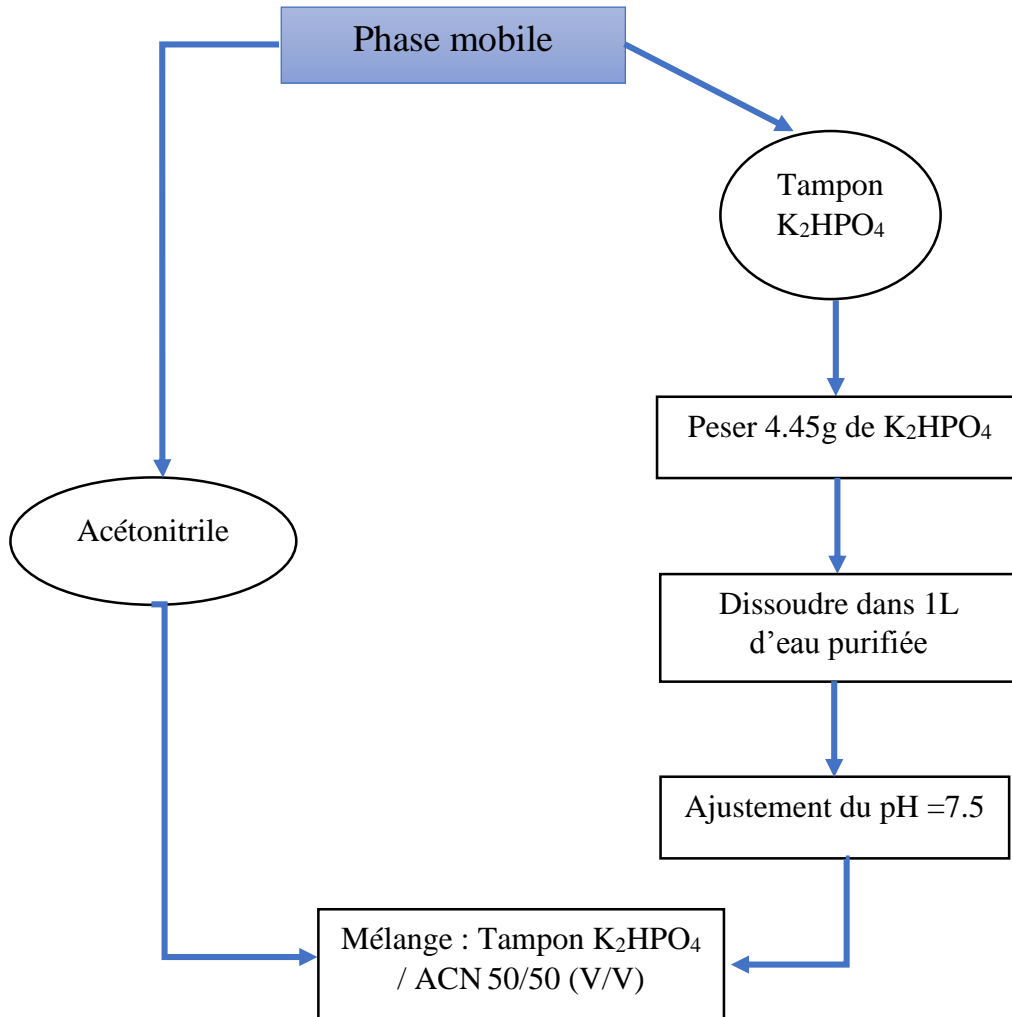
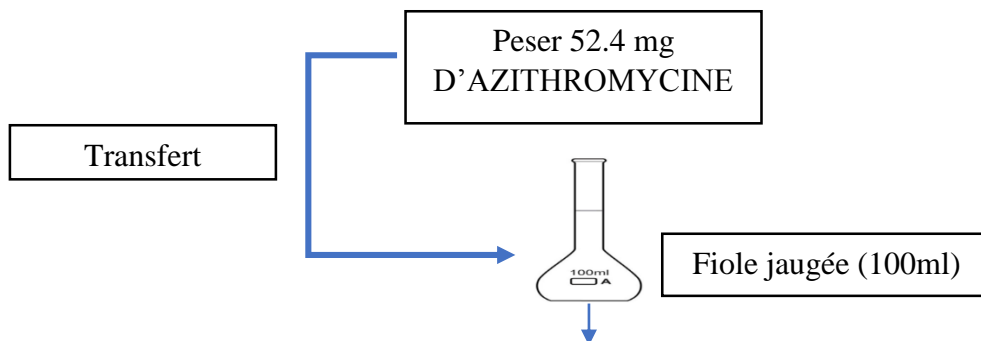


Schéma III.1. Protocole expérimental de préparation de la phase mobile.

- **Préparation de la solution standard**



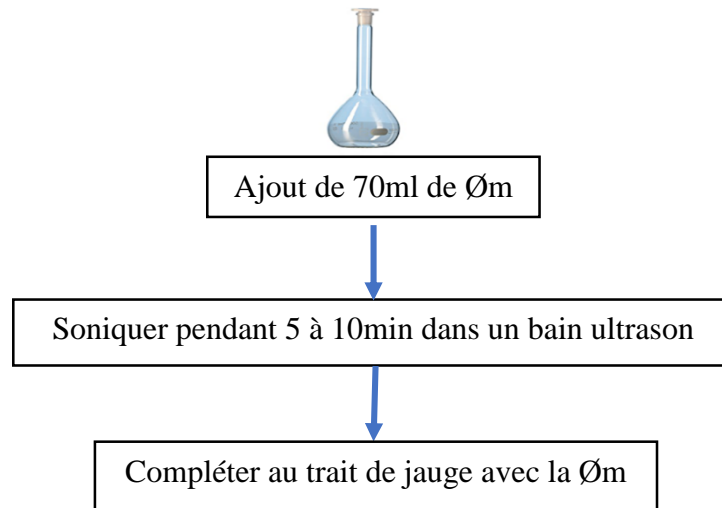
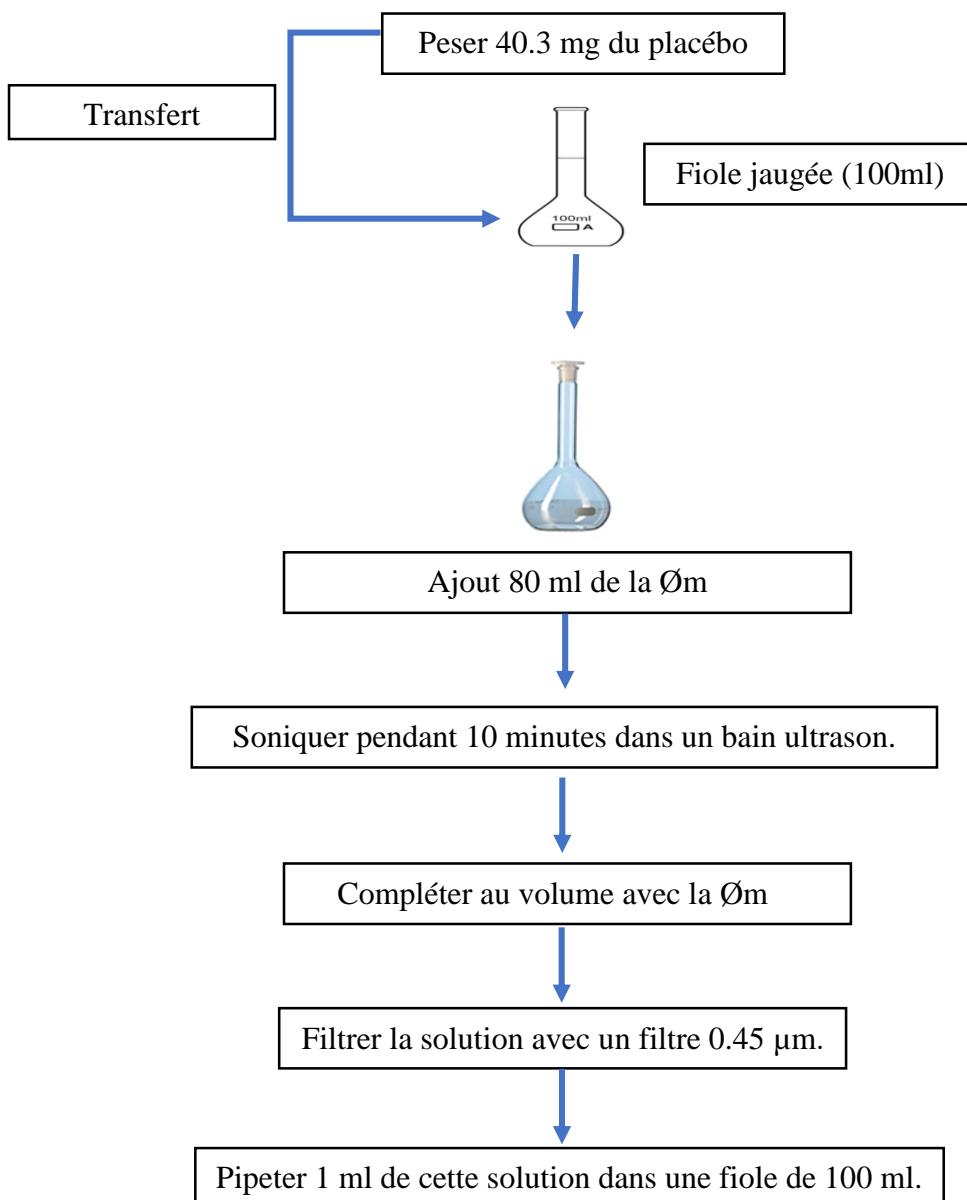


Schéma III.2. Protocole expérimental de la préparation de la solution standard

- **Préparation de la solution du placebo**





Compléter au volume et bien agiter.

Schéma III.3. Protocole expérimental de la préparation de la solution du placebo.

I.3. Recherche des conditions optimales, résultats et discussion

L'optimisation d'une méthode chromatographique doit prendre en considération plusieurs paramètres tels que : As, Nth et Tr.

Par ailleurs, il est important de noter que le « *Changement selon USP pour le mode isocratique* » est un mode de fonctionnement dans lequel la composition de la \emptyset_m est fixe.

I.3.1 Variation de la concentration K_2HPO_4

Le vial de la solution standard de l'AZITHROMYCINE di-hydraté préparée a été injectée 5 fois en modifiant la concentration du Tampon : 0,02M, 0,03M et 0,04M.

Les chromatogrammes de la solution d'AZITHROMYCINE dihydraté enregistrés dans les conditions chromatographiques : $\emptyset_m \{K_2 HPO_4 / ACN\}$ avec les différentes concentrations sont représentés dans les figures ci-dessous.

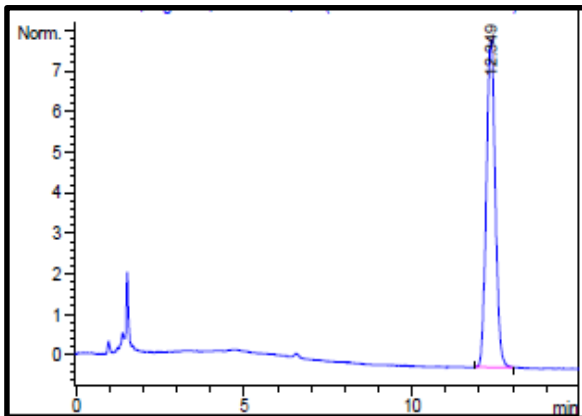


Figure III.3. Chromatogramme de concentration de 0,02M(K_2HPO_4)

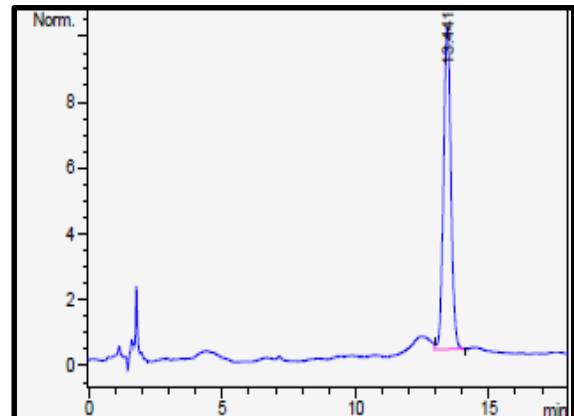


Figure III.4. Chromatogramme de concentration de 0,03M(K_2HPO_4)

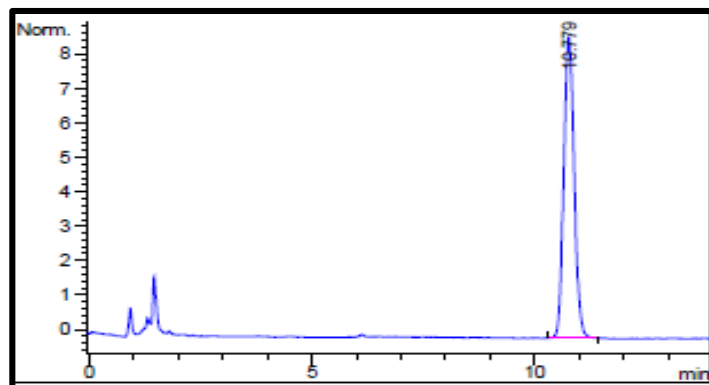


Figure III.5. Chromatogramme de concentration de 0,04M(K_2HPO_4)

Les résultats obtenus suite à la variation de la concentration de K_2HPO_4 sont regroupés dans le tableau III.3.

Tableau III.3. Résultats de la variation de la concentration de K_2HPO_4

Concentration (mol/l)	Temps de rétention (minutes)	Facteur de symétrie (As)	Nombre de plateaux théoriques (Nth)
0,02	12.349	1,051	10281
0,03	13.441	0,914	11372
0.04	10.779	1,071	10030
Valeurs choisies	0,02 <input checked="" type="checkbox"/>	0,03 <input type="checkbox"/>	0,04 <input type="checkbox"/>

A l'issu de ce tableau, il est à noter que la variation de la concentration du sel de la $\emptyset m$ K_2HPO_4 (0,02M, 0,03M et 0,04M) n'a pas montré un changement significatif sur les paramètres As et Nth.

Par conséquent, la valeur 0,02 mol/l a été retenue comme étant la concentration optimale car elle permet de conserver la colonne en raison de sa faible concentration.

I.3.2. Variation des proportions de la phase mobile

La variation des proportions de la phase mobile a été effectuée avec des proportions du solvant minoritaire +/- 30% de sa première portion en termes relatifs. Ainsi, cette variation a mené à la préparation de deux solutions :

- 1ère solution : 35% de phosphate dibasique ($K_2 HPO_4$) et 65% d'acétonitrile (ACN).
- 2ème solution : 65% de $K_2 HPO_4$ et 35% d'ACN.

Les chromatogrammes de la solution D'AZITHROMYCINE Dihydraté enregistrés dans les conditions chromatographiques : $\emptyset m$ { $K_2 HPO_4$ à 0,02M-ACN } sont représentés dans les figures ci-dessous.

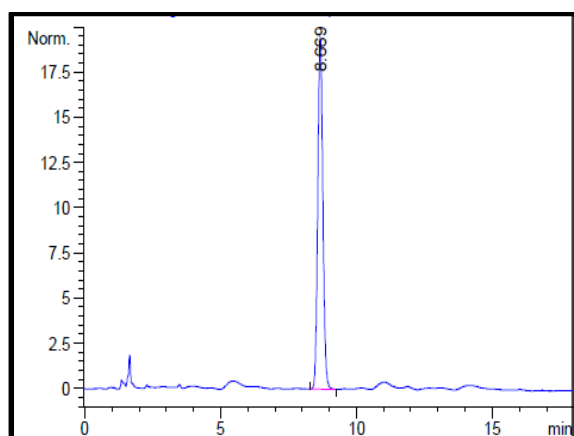


Figure III.6. Chromatogramme phase mobile { $K_2 HPO_4$ /ACN (35/65): V/V }

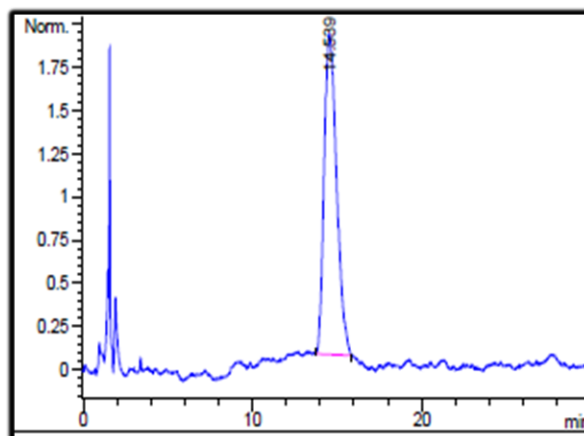


Figure III.7. Chromatogramme phase mobile { $K_2 HPO_4$ ACN (65/35):V/V }

Les résultats obtenus à l'issu de cette variation sont représentés dans le tableau III.4

Tableau III.4. Résultats de la variation des proportions de la phase mobile

Composition		Temps de rétention (minutes)	Facteur de symétrie	Nombre de plateaux théoriques
Acétonitrile	Tampon			
65	35	8,669	1,05	10182
35	65	14,539	0,70	1861
Valeurs choisies		(65/35)	<input checked="" type="checkbox"/>	(35/65) <input type="checkbox"/>

Les résultats des paramètres figurants dans le tableau III.4 (As et Nth) sont jugés satisfaisants pour les proportions (Tampon /ACN (35/65). Par ailleurs, les proportions (Tampon /ACN) (65/35) n'ont pas donné de bons résultats car l'augmentation de l'ACN induit une élution rapide. En effet, ceci est expliqué par la grande affinité de l'AZITHROMYCINE vis-à-vis du solvant organique.

De ce fait, le choix pour une Øm constituée de 65% ACN et 35% tampon a été sélectionnée comme valeur optimale.

I.3.3. Variation du pH du tampon de la phase mobile

Dans cette partie une variation de +/- 0.2% a été réalisée. Ainsi, une solution de 350 ml du tampon K₂HPO₄ a été préparée suivit d'un ajustement du pH jusqu'à 7.5 à l'aide de H₃PO₄ pour, enfin, finir avec l'ajout de 650 ml d'ACN.

D'autre part, le vial de la solution standard de l'AZITHROMYCINE préparée a été injectée à chaque fois deux fois en utilisant les mêmes conditions chromatographiques avec l'utilisation d'une Øm à pH varié de 7.5, 7.4 et 7.6.

Les chromatogrammes de la solution D'AZITHROMYCINE Dihydraté enregistrés dans les conditions chromatographiques : Øm {K₂ HPO₄ à 0,02M-ACN (35/65 : V/V)} à pH= 7.5, 7.4 et 7.6 sont représentés dans les figures ci-dessous.

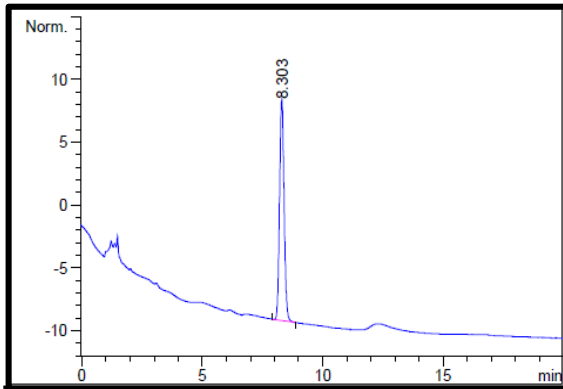


Figure III.8. Chromatogramme pH=7,4

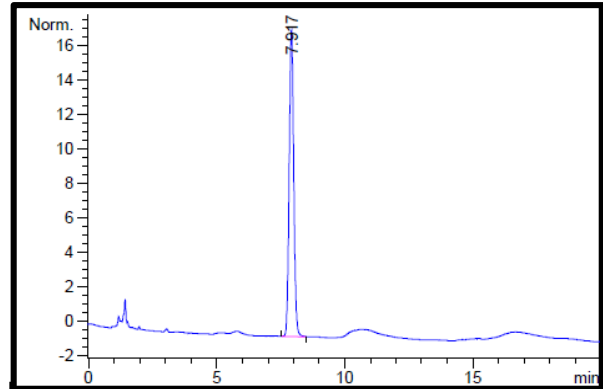
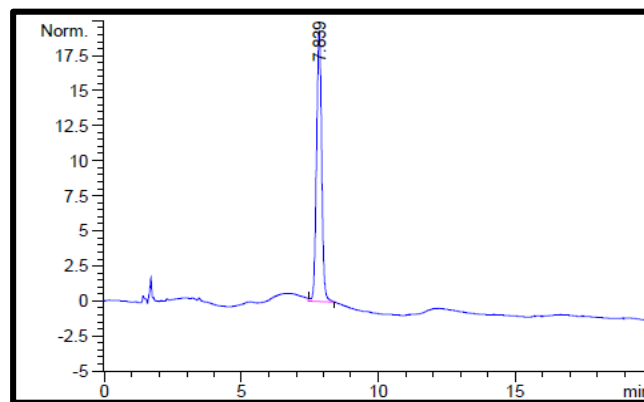


Figure III.9. Chromatogramme pH =7,5



FigureIII.10. Chromatogramme pH=7,6

Les résultats obtenus après la variation du pH sont portés dans le tableau III.5.

Tableau III.5. Résultats de la variation du pH

pH	Temps de rétention (minutes)	Facteur de symétrie	Nombre de plateaux théoriques
7,4	7,84	1.09	8511
7,5	7,92	1.107	9507
7,6	8,3	1.121	9137
Valeurs choisies	7,4 <input type="checkbox"/>	7,5 <input checked="" type="checkbox"/>	7,6 <input type="checkbox"/>

A l'issu des résultats obtenus, il est à noter qu'aucun changement significatif n'a été observé pour la variation sur les 3 valeurs du pH de la $\emptyset m$. Ainsi, les paramètres A_s et N_{th} sont

stables, toutefois, l'instabilité de la ligne de base pour les deux valeurs (7,4 et 7,6) est légèrement remarquable. Donc, la valeur du pH=7,5 a été retenue.

I.3.4. Variation du débit

Afin d'effectuer une variation du débit des proportions de +/-50% a été réalisée. Ainsi, le vial de la solution standard d'AZITHROMYCINE Dihydratée préparée a été injectée à chaque fois deux fois en utilisant les mêmes conditions chromatographiques avec une variation de débit à 0,5ml/min, 1 ml/min et à 1,5 ml/min.

Les chromatogrammes de la solution d'AZITHROMYCINE Dihydraté enregistrés dans les conditions chromatographiques : Øm {K₂ HPO₄ à 0,02M-ACN (35/65 : V/V)} sont représentés sur les figures III.11, III.12 et III.13.

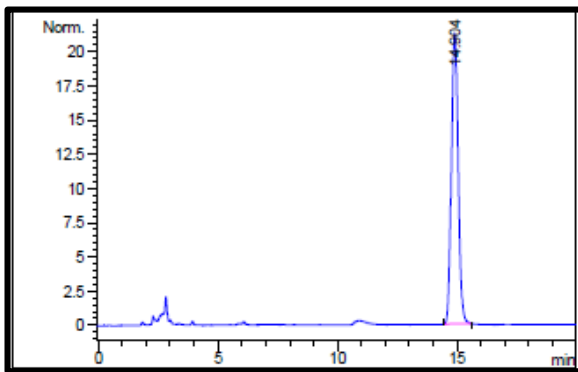


Figure III.11. Chromatogramme débit 0,5ml/min.

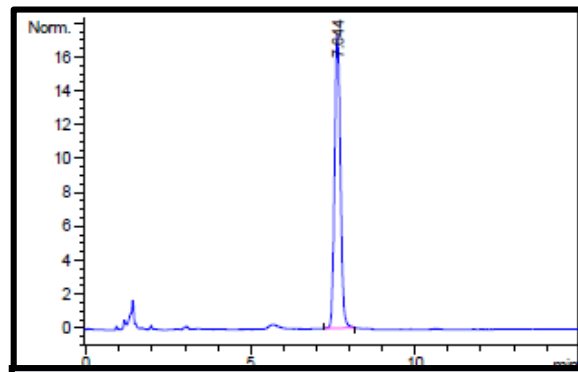


Figure III.12. Chromatogramme débit 1,0ml/min.

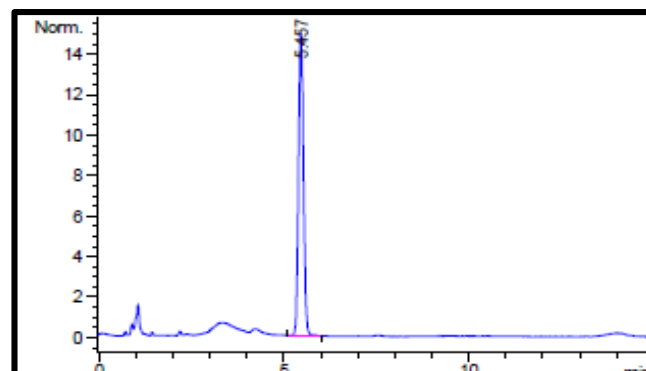


Figure III.13 : Chromatogramme débit 1,5ml/min.

L'essentiel des résultats obtenus issu de la variation du débit sont illustrés dans le tableau III.6.

Tableau III.6. Résultats de la variation du débit

Débit (ml/min)	Temps de rétention (minutes)	Facteur de symétrie	Nombre de plateaux théoriques
0.5	15,089	1.125	13708
1	7,644	1.06	8864
1.5	5,457	1.045	7669
Valeurs choisies	0.5 <input type="text"/>	1 <input type="text" value="x"/>	1.5 <input type="text"/>

Les valeurs obtenues montrent que le t_r de l'AZITHROMYCINE dépend fortement du débit de la $\emptyset m$. Ainsi, plus le débit est élevé plus le t_r est réduit et donc la durée de l'analyse est plus courte. Par conséquent, le débit 1ml/min est sélectionné suite au t_r qui reste moyen avec une pression de la pompe faible.

I.3.5. Variation de la Température

Une solution à 100 % de principe actif a été injectée trois fois dans les mêmes conditions chromatographiques, en revanche, un changement de température de la colonne est effectué à chaque reprise avec une variation +/- 10% de la température prescrite (40C°).

Les chromatogrammes de la solution d'AZITHROMYCINE Dihydraté enregistrés dans les conditions chromatographiques : $\emptyset m$ {K₂ HPO₄ à 0,02M-ACN (35/65 : V/V)} sont représentés dans les figures III. 14, III.15 et III.16.

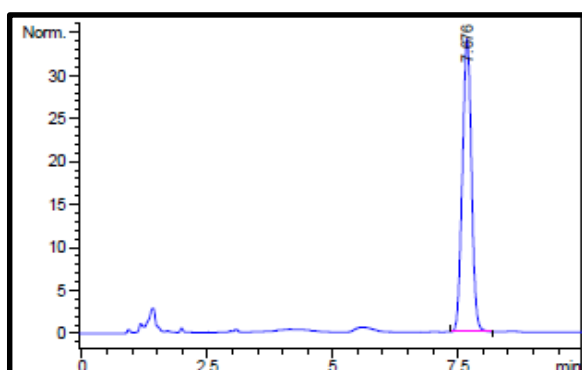


Figure III.14. Chromatogramme température 36°C.

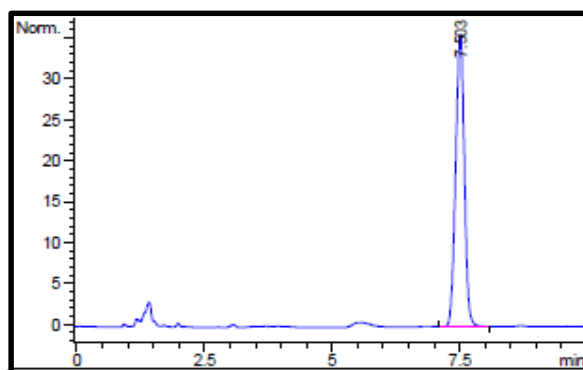


Figure III.15. Chromatogramme température 40°C.

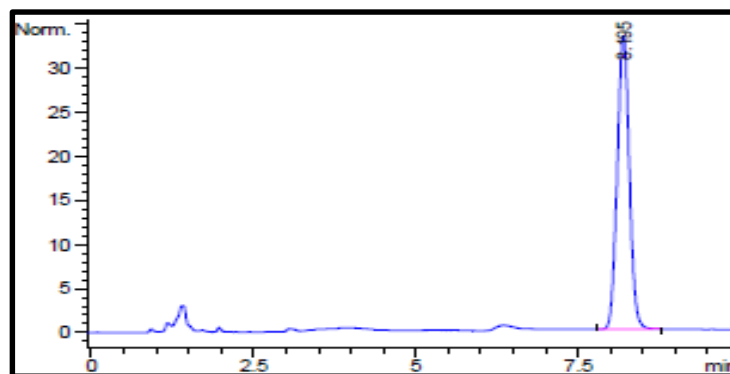


Figure III.16. Chromatogramme température 44°C.

Les résultats obtenus après la variation de la température sont exposés dans le tableau III.7.

Tableau III.7. Résultats de la variation de la température

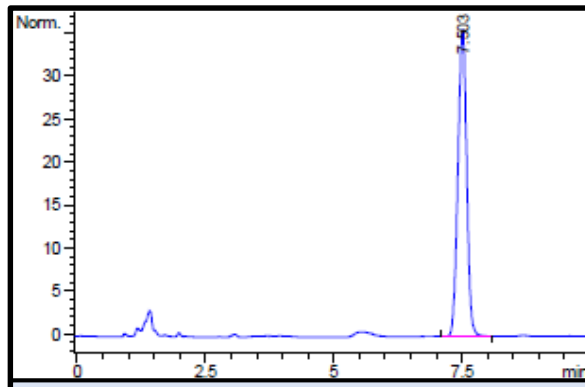
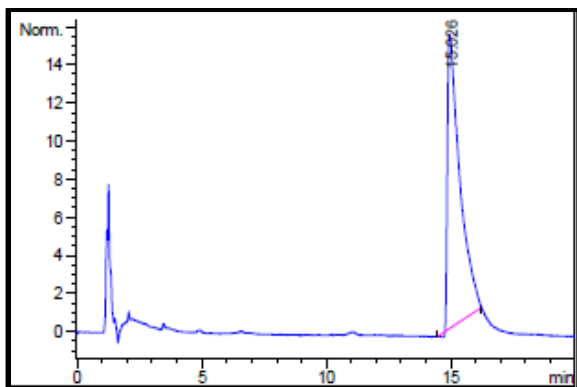
Température (°C)	Temps de rétention (minutes)	Facteur de symétrie	Nombre de plateaux théoriques
36	7,503	1	8742
40	7,676	1	8345
44	8,195	1.109	9099
Valeurs choisies	36 <input type="checkbox"/>	40 <input checked="" type="checkbox"/>	44 <input type="checkbox"/>

D'après les trois chromatogrammes obtenus, aucun changement significatif pour la variation de la température de la \emptyset_m sur les 3 valeurs n'a été constaté. Il est également important de noter que les paramètres A_s , N_{th} et t_r sont stables. Ainsi, la température 40°C a été choisie comme valeur optimale de cette variation.

I.3.6. Variation de la marque de la colonne

Une solution à 100 % du principe actif a été injectée deux fois dans les mêmes conditions chromatographiques mais avec changement de marque de la colonne qui passe de MERCK à KNAUER.

Les chromatogrammes de la solution D'AZITHROMYCINE Dihydraté enregistrés dans les conditions chromatographiques : \emptyset_m { $K_2 HPO_4$ à 0,02M-ACN (35/65 : V/V)} sont représentés dans les figures ci-dessous.



Le tableau III.8 indique les résultats obtenus après la variation de la marque de la colonne.

Tableau III.8. Résultats de la variation de la marque de la colonne

Marque de la colonne	Temps de rétention (minutes)	Facteur de symétrie	Nombre de plateaux théoriques
MERCK C18 (150mmx4.6mm)	7,676	1	8345
KNAUER C18 (150mmx4.6mm)	15,026	0.38	4453
Valeurs choisies	MERCK <input checked="" type="checkbox"/>		KNAUER <input type="checkbox"/>

Du tableau III.8, un changement significatif sur le t_r , N_{th} et A_s a été observé. De plus, d'après la figure III.17, l'utilisation de la colonne KNAUER entraîne un pic chromatographique avec une faible trainée contrairement à la colonne MERCK, qui, elle se traduit par un pic chromatographique plus symétrique, cela explique la réduction de la valeur du A_s ($A_s=1$ à $A_s=0.38$).

Ainsi, il est à noter que l'utilisation de la colonne de type MERCK a permis d'avoir un temps d'analyse plus court contrairement à la colonne de la marque KNAEURE. En conclusion, il est recommandé d'utiliser la colonne de la marque MERCK.

Au terme de cette partie, les paramètres optimaux retenus sont :

- Concentration de la phase mobile = 0.02 M
- Les proportions de la \varnothing_m : {K₂ HPO₄/ACN (35/65): V/V}

- pH de la $\emptyset m = 7.5$
- Débit= 1ml/min
- Température = 40°C
- Colonne : MERCK

II. TEST DE CONFORMITE DU SYSTEME

Dans le schéma III.4 sont résumées les différentes étapes de préparation de la solution échantillon à 0,5mg/ml dans le but d'effectuer le test de conformité.

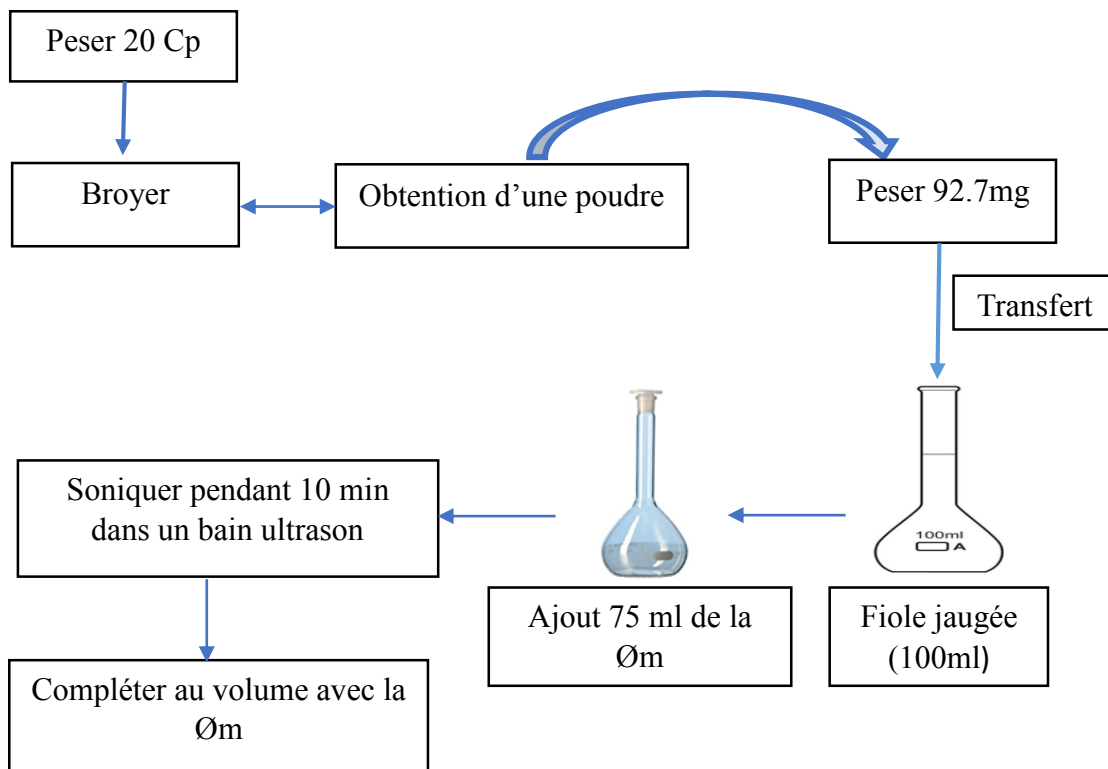


Schéma III.4. Protocole expérimental de la préparation de la solution échantillon.

La conformité du système chromatographique a été démontrée en analysant cinq fois la solution standard. Les chromatogrammes obtenus sont regroupés ci-dessous.

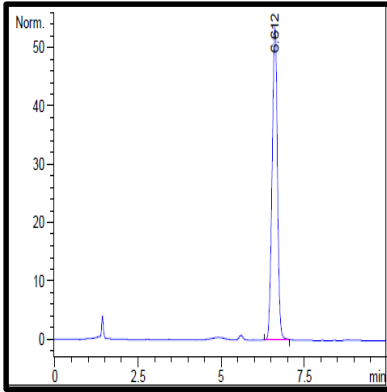


Figure III.19.
Chromatogramme de 1^{ère}
injection du principe actif

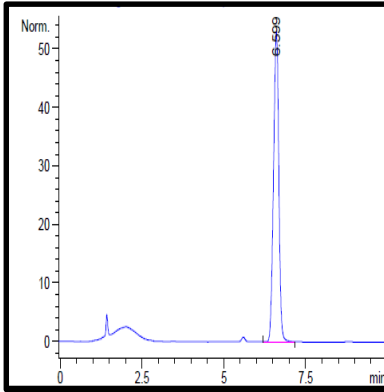


Figure III.20.
Chromatogramme de 2^{ème}
injection du principe actif

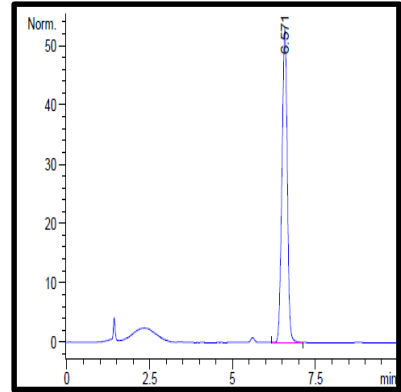


Figure III.21.
Chromatogramme de 3^{ème}
injection du principe actif

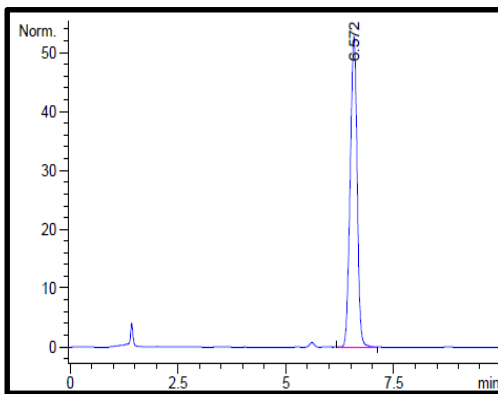


Figure III.22. Chromatogramme
de 4^{ème} injection du principe actif

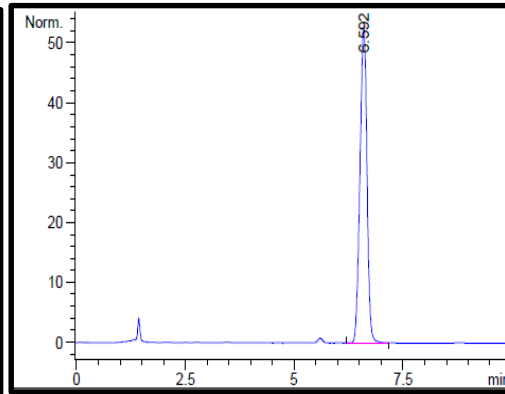


Figure III.23. Chromatogramme
de 5^{ème} injection du principe actif

Les résultats issus de ces cinq injections sont rassemblés dans le tableau III.9.

Tableau III.9. Calcul du % coefficient de variation.

Lecture/Injection N°	Signal du standard 1 (mua)
1	591,52
2	590,17
3	587,28
4	585,82
5	584,41
Moyenne	587.84

Ecart type	2.96
CV (%)	0.50

Après la réalisation des cinq injections, les calculs du nombre de plateaux théoriques, facteur de symétrie, coefficient de variation ainsi que le pourcentage de recouvrement ont été établis. A l'issue de ce test, les quatre paramètres cités doivent impérativement répondre aux normes exigées par les critères d'acceptation de la pharmacopée USP.

Le tableau III.10 indique les résultats des quatre paramètres étudiés pour le principe actif.

Tableau III.10. Comparaison des résultats de A_s , N_{th} , CV et R% avec les critères d'acceptation

Paramètres	Résultats	Critères d'acceptation
Nombre de plateaux théoriques	8062	>2000
Facteur de symétrie	1.1	<2
Coefficient de variation (CV)	0.50	$\leq 2,0\%$
Recouvrement	100.22	[98,0 – 102,0] %

Par conséquent, les résultats obtenus répondent aux critères d'acceptation (USP); ce qui implique que la performance du système HPLC utilisé est conforme et apte à effectuer les analyses quantitatives et qualitatives.

III. METHODOLOGIE ET INTERPRETATION DES RESULTATS DE LA VALIDATION

L'ensemble des opérations effectuées dans cette partie sont en vue de prouver que la procédure optimisée est suffisamment exacte et fiable selon les exigences réglementaires de la pharmacopée Américaine (USP).

III.1. Spécificité

L'étude de la spécificité de la méthode passe par la comparaison entre les chromatogrammes du blanc, standard et placebo.

La spécificité a été démontrée par une comparaison des pics du principe actif avec ceux de la solution de dilution ($\emptyset m$) et du placebo.

Les chromatogrammes obtenus sont illustrés dans les figures ci-dessous.

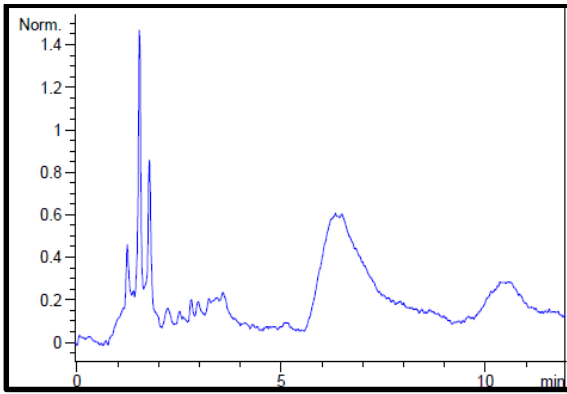


Figure III.24. Chromatogramme du blanc (Øm)

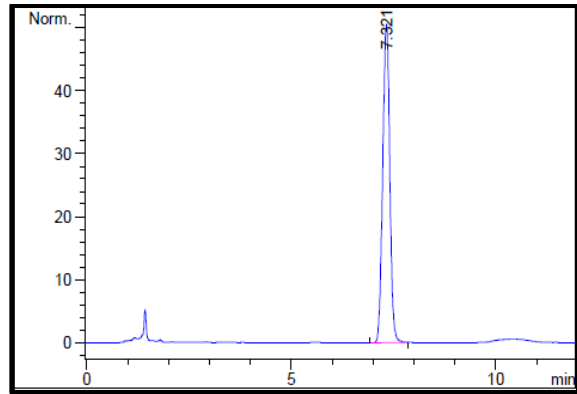


Figure III.25. Chromatogramme du Standard

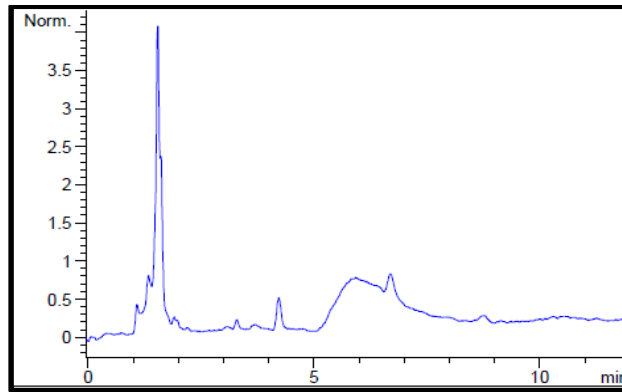


Figure III.26 : Chromatogramme du placebo

Les chromatogrammes obtenus montrent que le placebo et la Øm ne présente aucun pic au temps de rétention correspondant à celui de l'AZITHROMYCINE (principe actif). De ce fait, la méthode de dosage utilisée dans cette étude a été jugée spécifique.

III.2. Linéarité

L'étude de la linéarité est réalisée sur le principe actif seul et la forme reconstituée. La gamme de concentrations étudiée est : 80%, 90%, 100%, 110% et 120%.

Les différentes solutions préparées pour cette étude sont injectées. Ainsi, les surfaces des pics sont données dans les tableaux III.11.

Tableau III.11. Surfaces des pics du principe actif et forme reconstituée.

Pourcentage (%)	Concentration (mg/ml)	Surfaces (mua)	Pourcentage (%)	Concentration (mg/ml)	Surfaces (mua)
0%	0	0	0%	0	0
80%	0,423	456,4	80%	0.418	485.79

	0,422	458,06		0.419	485.51
	0,424	454,22		0.418	483.02
90%	0,473	510,52	90%	0.46	522.95
	0,474	509,53		0.471	539.89
	0,471	506,29		0.479	555.01
100%	0,527	570,13	100%	0.525	614.38
	0,519	557,89		0.527	605.46
	0,529	571,8		0.523	606.82
110%	0,571	606,49	110%	0.576	678.07
	0,572	608,66		0.578	673.66
	0,572	611,72		0.575	665.95
120%	0,629	681,81	120%	0.632	730.17
	0,628	672,09		0.628	725.54
	0,62	658,22		0.634	731.58

Les droites de régression du principe actif et la forme reconstituée ont été déterminées à partir des surfaces des pics obtenues à l'issue des graphes illustrés dans la figure III.27 ci-dessous.

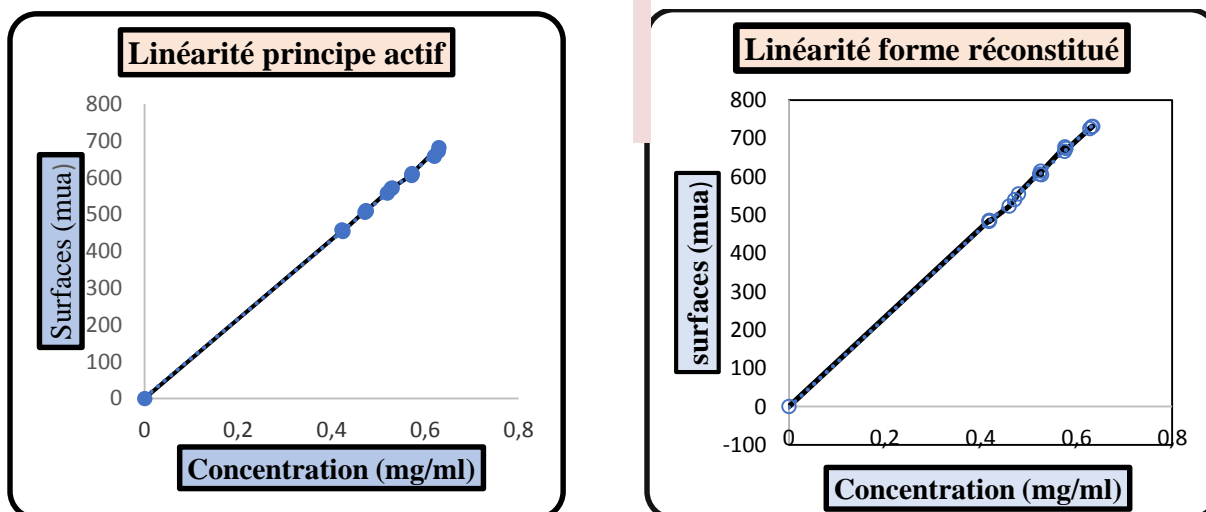


Figure III.27. Courbes d'étalonnage de l'AZITHROMYCINE dans la solution du principe actif et la forme reconstituée.

Il a été observé que la courbe d'étalonnage de l'AZITHROMYCINE est linéaire sur toute la gamme de concentration de 80% à 120%. De plus, l'équation de la droite de régression et de la forme : $Y : ax + b$ (x = concentration de l'AZITHROMYCINE (mg/ml) et y = surfaces des pics (mua)). Ainsi, et grâce à ces résultats, les paramètres de la droite de régression (Linéarité) ont été déterminées (tableau III.12).

Tableau III.12 : Paramètres de la droite de régression (Linéarité).

	Forme reconstituée	Principe actif seul	Critères d'acceptation selon l'USP
Pentes	1161.24	1069,39	Reportée uniquement
Ordonnées à l'origine des droites d'ajustement	-3.36	3,11	± 3 %
Coefficients de corrélation (r)	0,999625171	0,999230218	≥ 0,999

Il ressort de ce tableau que l'ensemble des résultats obtenus se rapprochent fortement des critères d'acceptation de l'USP. De plus, d'après les valeurs de coefficients de corrélations, les droites de régressions du principe actif seule et de la forme reconstituée sont proches de 0.999.

En conclusion, il existe une relation linéaire significative entre la surface et la concentration.

III.3. Fidélité

La fidélité est évaluée à deux niveaux :

- **Répétabilité** : Elle permet de caractériser la variabilité de la méthode dans la même journée pour la vérifier, ainsi, une solution standard de l'AZITHROMYCINE (100%) est injectée six fois durant la même journée et dans les mêmes conditions opératoires.

- **Fidélité intermédiaire** : Elle permet de caractériser la variabilité de la méthode sur deux jours par deux analystes.

La répétabilité et la fidélité intermédiaire sont évaluées à l'aide du coefficient de variation calculé à partir de six solutions de concentration à 100%.

Les surfaces des pics obtenues sont regroupées dans les tableaux ci-dessous.

Tableau III.13. Surfaces des pics de précision

Essais	Concentration (mg/ml)	Surfaces (mau)
1	0,527	591,52
		590,17
		587,28
		585,82
		584,41

Tableau III.14. Surfaces des pics de répétabilité

Essais	Concentration (mg/ml)	Surfaces (mau)
1	0,529	587,13
2	0,517	587,3
3	0,527	581,66
4	0,531	587,27
5	0,529	586,52

		583,58		6	0,52	573,67
Moyenne	587,13	Reportée uniquement		Moyenne	583,93	Reportée uniquement
$\delta =$	3,17	Reporté uniquement		$\delta =$	5,48	Reporté uniquement
CV =	0,54	≤ 2		CV =	0,94	≤ 2

Tableau III.15. Surfaces des p... la fidélité intermédiaire

Jours	Essai	(mg/ml)	Surfaces (mau)
1	1	0,529	587,13
	2	0,518	587,3
	3	0,527	581,66
	4	0,531	587,27
	5	0,531	586,52
	6	0,522	573,67
2	1	0,527	570,94
	2	0,527	570,42
	3	0,525	570,55
	4	0,529	571,84
	5	0,525	582,55
	6	0,528	561,54
Moyenne	577,62		Reportée uniquement
$\delta =$	8,80		Reporté uniquement
CV =	1,52		≤ 2

Les coefficients de variations de la précision, répétabilité et fidélité intermédiaire obtenues pour l'AZITHROMYCINE 100% sont $\leq 2\%$ (valeur fixée par les normes pharmaceutiques de l'USP). De ce fait, la fidélité de la méthode est jugée acceptable.

La répétabilité et la fidélité intermédiaire sont évaluées à l'aide du coefficient de variation calculé à partir de 6 solutions de concentration 100% de la forme reconstituée. Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau III.16 : Surfaces des pics de la précision

Essais	C (mg/ml)	Surfaces (mau)
1	0,525	572,62
		573,31
		572,07
		572,06
		572,88
		571,79
Moyenne	572,46	Reportée uniquement
$\partial =$	0,58	Reporté uniquement
CV =	0,10	≤ 2

Tableau III.17 : Surfaces des pics de la répétabilité

Essais	C (mg/ml)	Surfaces (mau)
1	0,525	572,62
2	0,525	570,22
3	0,525	580,13
4	0,524	578,95
5	0,528	565,07
6	0,523	574,35
Moyenne	573,56	Reportée uniquement
$\partial =$	5,60	Reporté uniquement
CV =	0,98	≤ 2

Tableau III.18. Surfaces des pics de fidélité intermédiaire

Jours	Essai	C (mg/ml)	Surfaces (mau)
1	1	0,528	572,62
	2	0,528	570,22
	3	0,528	580,13
	4	0,523	578,95
	5	0,519	565,07
	6	0,525	574,35
2	1	0,524	558,57
	2	0,524	557,32
	3	0,524	556,95
	4	0,526	555,77
	5	0,529	560,14
	6	0,529	566,05
Moyenne	566,35	Reportée uniquement	
$\partial =$	8,79	Reporté uniquement	
CV =	1,55	≤ 2	

Les coefficients de variations de la précision, répétabilité et fidélité intermédiaire obtenues pour la forme reconstituée de l'AZITHROMYCINE sont $\leq 2\%$ (valeur fixée par les normes pharmaceutiques de l'USP). Par conséquent, la fidélité de la méthode est jugée acceptable.

Ainsi, les résultats de fidélité et d'exactitude satisfont aux normes des critères d'acceptations selon l'USP, en conclusion, la méthode est fidèle et exacte.

III.4. Exactitude

L'exactitude est déterminée sur les cinq échantillons utilisés dans l'étude de la linéarité. Le principe de l'exactitude est de calculer les valeurs de recouvrements en pourcentage (%) entre les quantités retrouvées et les quantités introduites. De ce fait, elle est déterminée par le calcul du recouvrement à partir des résultats de 15 analyses individuelles d'échantillons.

Le recouvrement du principe actif est calculé par rapport à la concentration introduite et retrouvée. Le tableau III.19 ci-dessous résume les résultats obtenus.

Tableau III.19. Paramètres de l'exactitude du principe actif.

Essais	Pourcentage (%)	Quantités introduites (mg/ml)	Quantités retrouvées (mg/ml)	Surfaces (mua)	Recouvrements (%)
A1	80	0,423	0,42	456,4	100,21
A2		0,422	0,43	458,06	100,81
A3		0,424	0,42	454,22	99,49
B1	90	0,473	0,48	510,52	100,31
B2		0,474	0,47	509,53	99,91
B3		0,471	0,47	506,29	99,90
C1	100	0,527	0,53	570,13	100,61
C2		0,519	0,52	557,89	99,96
C3		0,529	0,53	571,8	100,53
D1	110	0,571	0,57	606,49	98,81
D2		0,572	0,57	608,66	99,16
D3		0,572	0,57	611,72	99,66
E1	120	0,629	0,64	681,81	101,06
E2		0,628	0,63	672,09	99,77
E3		0,62	0,61	658,22	98,96
				Moyenne	99,89

Les données du tableau III.19 ont mené à la réalisation du tracé du profil d'exactitude pour le principe actif qui est présenté sur la figure III.28.

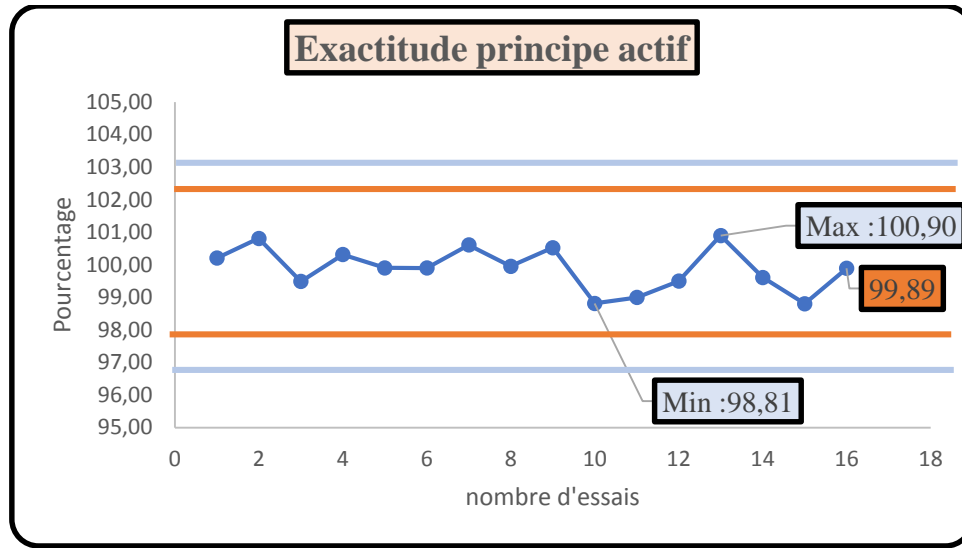


Figure III.28. Tracé du profil d'exactitude du principe actif

Les lignes continues horizontales en bleu révèlent l'intervalle d'acceptabilité pour les recouvrements individuels [97%-103%], quant à celles en rouges montrent l'intervalle d'acceptabilité pour le recouvrement moyen [98%-102%].

A partir de la figure III.28, les résultats montrent que :

- Les recouvrements individuels sont inclus dans l'intervalle cité avec un minimum de recouvrement individuel qui est égale à 98.81% et un maximum égale à 100.90%.
- La valeur du recouvrement moyen est comprise dans l'intervalle.

Dans le tableau III.20 sont consignés les résultats obtenus du recouvrement des différents paramètres de l'exactitude de la forme reconstituée.

Tableau III.20. Paramètres de l'exactitude de la forme reconstituée

Essais	Pourcentage	Quantités introduites (mg/ml)	Quantités retrouvées (mg/ml)	Surfaces (mua)	Recouvrements
A1	80%	0,418	0,42	485,79	100,77
A2		0,419	0,42	485,51	100,47
A3		0,418	0,42	483,02	100,20
B1	90%	0,455	0,45	522,95	99,61
B2		0,471	0,47	539,89	99,32
B3		0,491	0,48	555,01	97,93

C1	100%	0,525	0,53	614,38	101,33
C2		0,527	0,52	605,46	99,48
C3		0,523	0,53	606,82	100,47
D1	120%	0,576	0,59	678,07	101,88
D2		0,578	0,58	673,66	100,87
D3		0,575	0,58	665,94	100,24
E1	140%	0,632	0,63	730,17	99,95
E2		0,628	0,63	725,54	99,95
E3			0,63	731,58	99,83
				Moyenne	100.15

Les données du tableau III.20 ont abouti à la réalisation du tracé du profil d'exactitude pour la forme reconstituée qui est présenté sur la figure III.29.

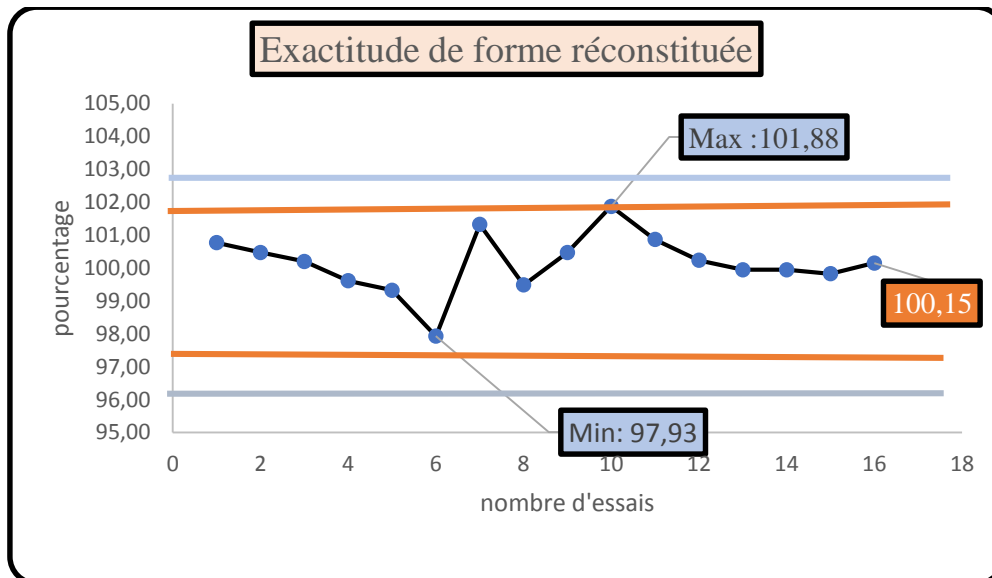


Figure III.29. Tracé du profil d'exactitude de forme reconstituée

Selon le tracé obtenu dans la figure III.29, les résultats des recouvrements individuels sont inclus dans l'intervalle cité avec un minimum du recouvrement individuel égale à 97.93% et un maximum égale à 101.88%. De même pour la valeur du recouvrement moyen dont la valeur est comprise dans l'intervalle.

En résumé, l'ensemble des résultats issus des deux tracés (figure III.28 et figure III.29) sont donnés dans le tableau III.21.

Tableau III.21. Comparaison de l'exactitude de la forme constituée et principe actif avec les normes d'acceptation.

	Forme reconstituée	Principe actif seul	Critères d'acceptation selon l'USP
Recouvrement moyen	99.96%	100.06%	98 - 102%
Coefficient de variation	0.91	0.78	≤2%

Compte tenu des résultats obtenus la procédure peut être considérée comme étant exacte sur tout l'intervalle du dosage prédéterminé.

IV. SYNTHÈSE DES RESULTATS

Au terme de cette étude, est mise en avant une comparaison entre les paramètres optimaux et les paramètres imposés par la dernière version de l'USP⁵⁴ (tableau III.22).

Tableau III.22. Comparaison entre les conditions optimisées au sein du laboratoire BEKER et celles publiées dans la dernière version de la pharmacopée Américaine

Conditions Chromatographiques	BEKER	Dernière version de la pharmacopée USP
Phase stationnaire (Colonne)	C18.Merck Dimensions : (150mm x 4,6mm, 5µm)	C18.Merck Dimensions : (150mm x 4,6mm, 5µm)
Température	40°C	50°C
Phase mobile	Tampon K ₂ HPO ₄ pH=7,5 /ACN (35/65)	Tampon KH ₂ PO ₄ pH=7.5 /ACN (35/65)
Débit	1,0 ml/min	2.0 ml/min
Longueur d'onde	210 nm	210 nm
Volume injecté	20 µl	100 µl

Compte tenu des résultats obtenus lors de cette étude, il est clairement remarquable que les conditions chromatographiques optimales qui ont été retenues lors d'optimisation, sont très proches des conditions publiées dans la dernière version de l'USP.

⁵⁴ United state pharmacopiea USP <1225>.

De plus, les résultats obtenus des paramètres de validation étudiés (conformité du système, spécificité, linéarité, exactitude et fidélité) satisfont aux critères d'acceptation. Par conséquent, la méthode du dosage est validée pour l'AZITHROMYCINE ® (comprimé 500mg) fabriqué par les laboratoires **BEKER**.

Conclusion

CONCLUSION

L'objectif de ce travail était de développer une méthode simple, efficace, rapide et surtout économique du dosage par HPLC de l'AZITHROMYCINE® fabriqué par les laboratoires BEKER. Dans ce contexte, un protocole expérimental préalablement établi dans le dossier technique du produit a été mis à exécution, mettant, de ce fait, en place de nouveaux paramètres optimaux aboutissant à des résultats qui se conforment aux normes mondiales dictées par les pharmacopées.

Ainsi, au terme de cette étude, une approche de plusieurs paramètres a été réalisée :

D'une part, l'étude de l'optimisation de la méthode HPLC a abouti à des résultats satisfaisants vis-à-vis des objectifs préétablis. De ce fait, la variation des conditions chromatographiques selon les exigences de l'USP a abouti à : une phase mobile constituée d'un mélange binaire acétonitrile-tampon phosphate $K_2 HPO_4$ à 0.02 M (65/35 ; v/v) de pH 7.5, à débit 1 ml/ min et une température de 40°C. Par conséquent, l'efficacité de cette variation a permis la diminution du temps de rétention et l'obtention de résultats très significatifs en termes de facteur de symétrie (A_s) et nombre de plateaux théoriques (N_{th}).

D'autre part, une fois que la méthode est optimisée, une vérification de la conformité du système HPLC renseignant sur l'aptitude à effectuer l'analyse a été réalisée, confirmant ainsi la capacité de ce système à séparer les constituants d'un composé par l'utilisation des paramètres tels que le facteur de symétrie et le recouvrement...

L'étude des critères de validation des méthodes analytiques a été effectuée. Ainsi, la technique utilisée dans cette étude (HPLC) a rempli toutes les exigences et performances spécifiques pour le dosage de l'AZITHROMYCINE en forme comprimé enrobé. Ainsi, la chromatographie liquide à haute performance utilisée s'est avérée être spécifique, linéaire, exacte, fidèle et robuste ; ce qui atteste de sa validité et son aptitude à être utilisée en routine pour le dosage de ce médicament.

En conclusion, cette étude s'est avérée très bénéfique pour le laboratoire industriel d'un point de vue économique, d'autant plus que les conditions et les paramètres retenus lors de la procédure sont conformément avec ceux publiés dans la dernière version de la pharmacopée.

Glossaire

Glossaire

Ce lexique donne les principales définitions des termes utilisés pour la rédaction de se présent manuscrit et dont la connaissance est utile.

Bonnes pratiques de fabrication (BPF) : ensembles de règles et de procédures devant être respectées lors de la fabrication d'un médicament.

Blanc : Essai réalisé en l'absence de matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (blanc matrice)

Comprimés : Sont définis à la pharmacopée européenne comme étant des préparations de consistance solide, contenant chacun une unité de prise ou plusieurs substances actives et obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules.

Contrôle de la qualité (CQ) : est une partie des BPF qui concerne les procédures relatives à l'échantillonnage, aux spécifications, aux analyses, à la documentation et à la mise en circulation.

Eluant : est un solvant utilisé pour entraîner les constituants à travers une phase stationnaire.

Elution : est un processus au cours duquel des solutés sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.

Excipient : est une substance, dans un médicament, autre que la substance active, destinée à apporter une consistance, un goût, une couleur à un médicament, tout en évitant toute interaction avec le principe actif.

Forme reconstituée : un mélange de tous les composants correspondant qualitativement à la forme pharmaceutique à étudier, excepté la substance à tester qui sera ajoutée en quantité variable suivant le critère étudié.

ICH : (International Council for Harmonisation) : est un comité crée à l'initiative de la communauté économique européenne et fonctionnant sous formes de conférences en vue d'harmoniser les exigences en matière d'AMM entre les Etats-Unis, le Japon et l'Union Européenne. Le rôle de l'ICH est de travailler à l'harmonisation des principes de qualité, sécurité et l'efficacité des médicaments.

Médicament : est un composé d'une substance active et de substance inerte convenablement à la voie d'administration, à laquelle il est acquis, appelée excipient.

Médicament générique : Un médicament générique est considéré comme essentiel similaire au médicament original, lorsqu'il a la même composition qualitative en principe(s) actif(s), qu'il est sous la même forme pharmaceutique et que, lorsque nécessaire, la bioéquivalence avec le premier produit a été démontrée par les études appropriées de biodisponibilité.

Pharmacopée : C'est un recueil à caractère officiel et réglementaire des matières premières autorisées pour la fabrication des médicaments. Elle contient les monographies des substances thérapeutiques, elle regroupe tous les médicaments qui peuvent être délivrés par un pharmacien et indique leurs dénominations communes, leurs caractères, les méthodes d'essai et d'analyse, les méthodes de conservation etc.

Placébo : 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.

Potentiel d'Hydrogène (pH) : correspond à la force d'acidité d'une solution aqueuse. Il a une valeur comprise entre 0 et 14.

Principe actif : c'est la substance responsable de l'effet pharmacologique du médicament.

Protocole : est un document descriptif et normatif planifiant intégralement dans le détail un essai ou une étude avant sa mise en œuvre.

Tampons : sont des systèmes chimiques (couples d'acide et de base conjuguée) dont la propriété est de s'opposer aux variations du pH imposés à la solution (il stabilise le pH d'une solution).

USP:(United States Pharmacopeia) est la pharmacopée officielle des États-Unis, publiée en double avec le National Formulary sous le nom d'USP-NF. Cette dernière est une organisation scientifique indépendante qui collabore avec les meilleurs experts mondiaux de la santé et de la science pour développer des normes de qualité pour les médicaments, les compléments alimentaires et les ingrédients alimentaires.

DEFINITION DE QUELQUES PARAMETRES STATISTIQUES

1-Coefficient de corrélation

Quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écarts types.

2-Coefficient de variation

Pour un caractère positif, il s'exprime par le rapport de l'écart type à la moyenne. Dans la plupart des cas, il est donné en pourcentage.

3-Ecart type

L'écart type se définit étant la racine carrée de la variance.

4-Ordonnée à l'origine

Endroit ou la droite d'un graphique coupe l'axe des ordonnés.

5-Pente

Angle que fait une droite sur un graphe par rapport à l'horizontale. Il est exprimé sous forme d'un rapport entre les valeurs d'Y et celle de X.

6-Variance

La variance est un paramètre statistique mesurant la dispersion des individus autour de la Moyenne.

Annexes

ANNEXES

Dans cette partie seront exposées des informations supplémentaires concernant les travaux réalisés en cours de l'étude.

ANNEXES I. Réactifs chimiques

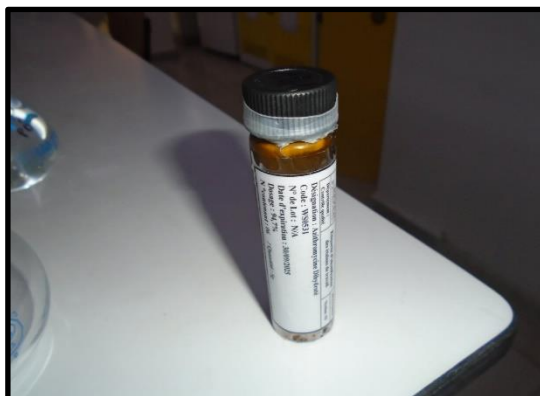


Figure 1. AZITHROMYCINE Dihydraté

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des réactifs chimiques

Réactifs	Propriétés physico-chimiques
<u>Acétonitrile</u> <u>grade HPLC</u>	<p>Dénomination : Acétonitrile.</p> <p>Formule moléculaire : CH₃CN.</p> <p>Masse molaire : 41.05 g/mol.</p> <p>Densité : 0.781 kg/l.</p> <p>Aspect : liquide.</p> <p>Couleur : incolore.</p> <p>Point d'ébullition : 81.6°C.</p> <p>Point de fusion : - 48°C.</p> <p>Point d'inflammation : 2°C.</p> <p>Pureté : 99.9%.</p> <p>Solubilité : miscible avec l'eau.</p> <p>Stabilité chimique : sensible à la chaleur.</p> <p>Condition de stockage : récipient bien fermé dans un local bien aéré, la manipulation se fait sous une hotte aspirante.</p>
<u>Hydrogéo</u> <u>phosphate de</u> <u>potassium</u>	<p>Dénomination : Hydrogéo phosphate de potassium.</p> <p>Formule moléculaire : K₂ HPO₄.</p> <p>Masse molaire : 174.20 g/mol</p> <p>Aspect : solide (sous forme de petits cristaux)</p> <p>Couleur : blanche</p>

ANNEXES

	<p>Pureté : 98%</p> <p>Solubilité : soluble dans l'eau et légèrement dans l'alcool</p> <p>Condition de stockage : récipients bien fermés à température ambiante et ambiance sèche</p>
<p><i>Acide phosphorique</i></p>	<p>Dénomination : Acide phosphorique</p> <p>Formule brute : H_3PO_4</p> <p>Masse molaire : 97.99 g/mol</p> <p>Aspect : liquide</p> <p>Couleur : transparente</p> <p>Pureté : [85%-88%]</p> <p>Solubilité : soluble dans l'alcool et très soluble dans l'eau chaude</p>

ANNEXES

ANNEXES II. Equipements et verreries



Figure 1 : Appareil de la HPLC

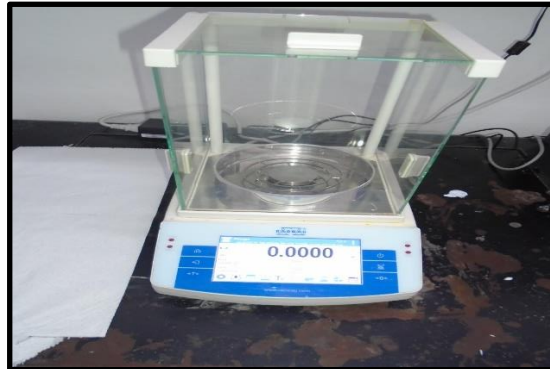


Figure 2 : Balance analytique



Figure 3 : Bain ultrason



Figure 4 : Eprouvette



Figure 5 : Fioles jaugées



Figure 6 : pH-mètre



Figure 7 : seringue avec filtre à nylon

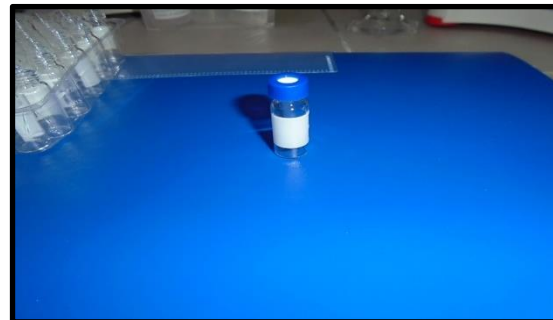
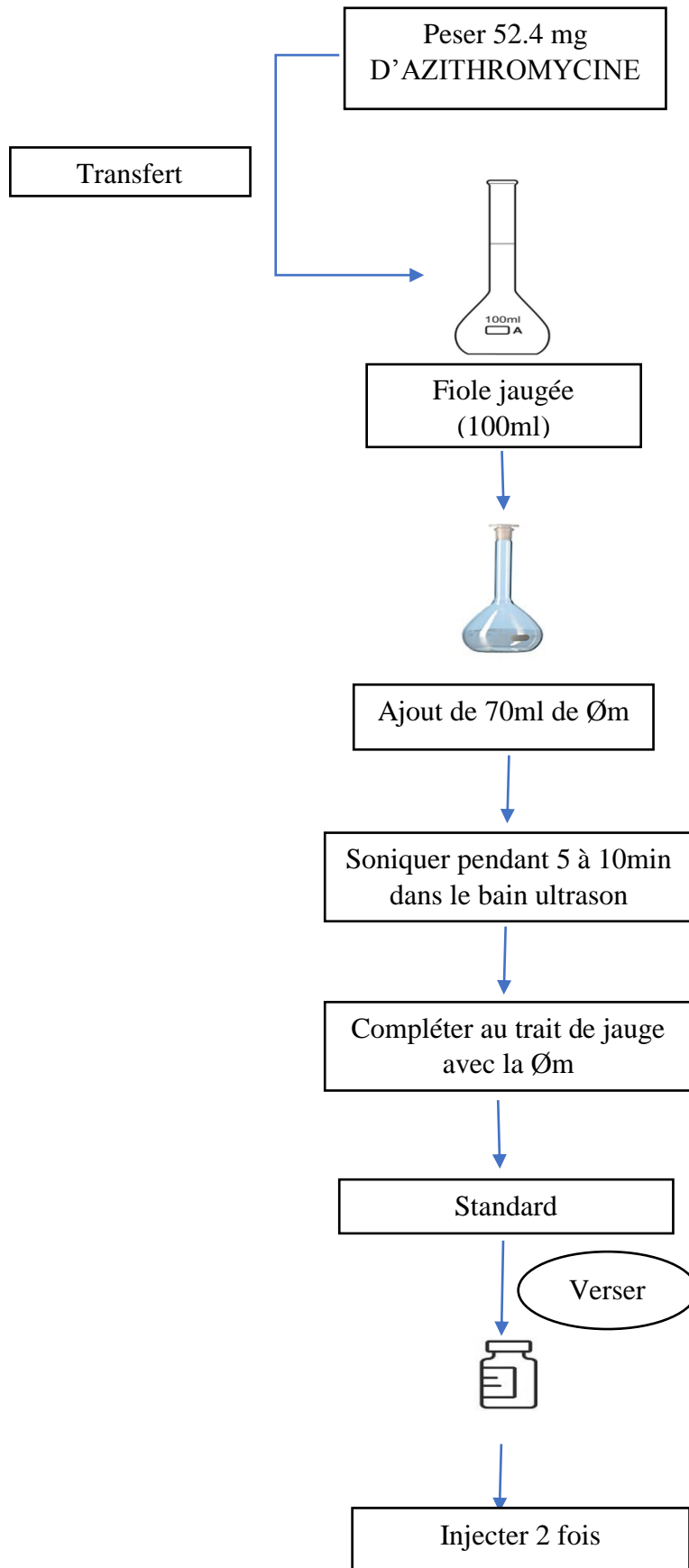


Figure 8 : Vial

ANNEXES

ANNEXES III. Protocole expérimental

ANNEXES III.1. Proportion de la phase mobile



ANNEXES

ANNEXES II. Protocole expérimentale

ANNEXES II.2. Spécificité

Spécificité :

Préparation des solutions

1/- Solution Le principe actif matière première à une concentration de 524 μ g / ml :

- Peser et transférer l'équivalent de 52.4 mg de l'azithromycine di hydraté dans une fiole de 100ml

- Ajouter 80ml de phase mobile
- Soniquer pendant 10minutes
- Laisser refroidir
- Compléter au volume avec de la phase mobile et bien mélanger

2/- Solution placebo :

- Peser et transférer 40.3mg de placebo dans une fiole de 100ml
- Ajouter 80ml de la phase mobile
- Soniquer pendant 10minutes
- Laisser refroidir
- Compléter au volume avec de la phase mobile et bien mélanger
- Filtrer la solution sur un filtre 0,45 μ m.

ANNEXES

ANNEXES III. Protocole expérimental

ANNEXES III.3. Linéarité

Linéarité et gamme d'étalonnage :

Gamme d'étalonnage du principe actif seul

80% correspondant à une masse de principe actif de 41.9 mg

90 % correspondant à une masse de principe actif de 47.2 mg

100 % correspondant à une masse de principe actif de 54.2 mg

110 % correspondant à une masse de principe actif de 57.6 mg

120 % correspondant à une masse de principe actif de 62.9mg

Préparation des solutions de principe actif :

- Dans une fiole de 100,0 ml, introduire chaque pesée d'AZITHROMYCINE Dihydraté suivant la gamme

- Ajouter 80ml de de la phase mobile

- Soniquer pendant 10minutes

- Laisser refroidir

- Compléter au volume avec de la phase mobile et bien mélanger

Gamme d'étalonnage de la forme reconstituée :

80 % correspondant à une masse de principe actif de 41.9 mg + 50.8 mg (de placebo)

90 % correspondant à une masse de principe actif de 47.2 mg + 45.6 mg (de placebo)

100 % correspondant à une masse de principe actif de 54.2 mg + 40.3 mg (de placebo)

110 % correspondant à une masse de principe actif de 57.6 mg + 35.1 mg (de placebo)

120 % correspondant à une masse de principe actif de 62.9 mg + 29.9 mg (de placebo)

Préparation des solutions de la forme reconstituée :

- Dans une fiole de 100,0 ml, introduire chaque pesée azithromycine 2H₂O et placebo suivant la gamme

ANNEXES

- Ajouter 80ml de la phase mobile
- Soniquer pendant 10minutes
- Laisser refroidir
- Compléter au volume avec de la phase mobile et bien mélanger
- Filtrer à l'aide d'un filtre 0,45 μm .

ANNEXES

ANNEXES IV. Chromatogrammes

ANNEXES IV.1. Principe actif (Linéarité)

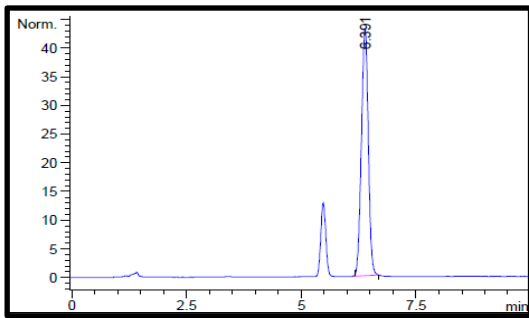


Figure 1. Chromatogramme principe actif 80% - 1

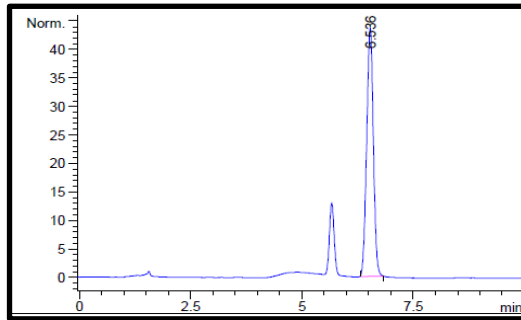


Figure 2. Chromatogramme principe actif 80% - 2

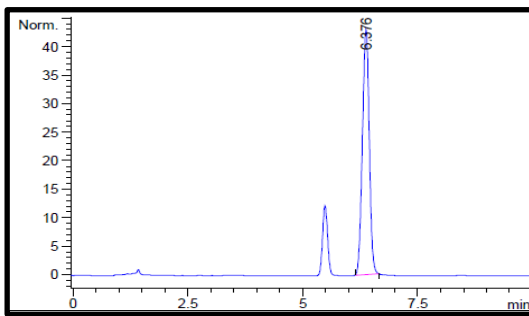


Figure 3. Chromatogramme principe actif 80% - 3

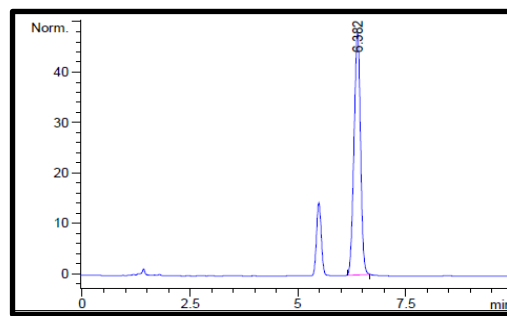


Figure 4. Chromatogramme principe actif 90% - 1

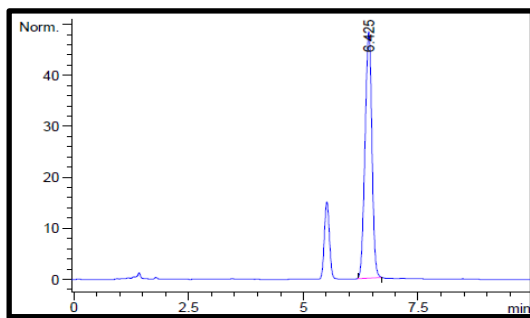


Figure 5. Chromatogramme principe actif 90% - 2

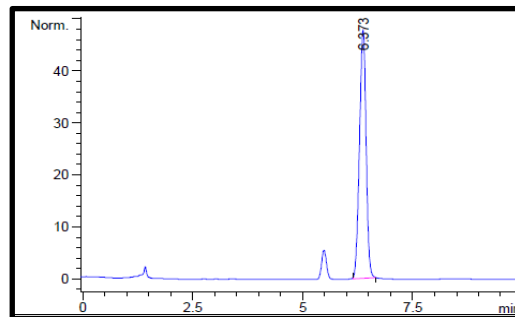


Figure 6. Chromatogramme principe actif 90% - 3

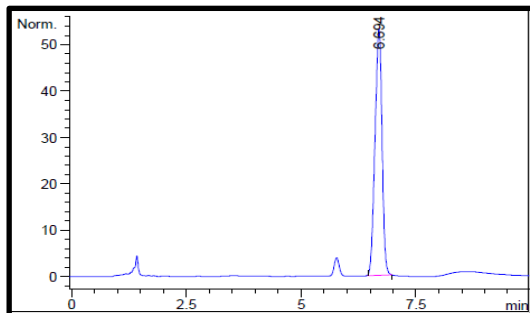


Figure 7. Chromatogramme principe actif 100% - 1

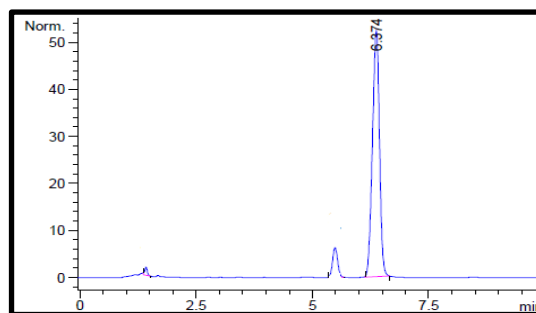


Figure 8. Chromatogramme principe actif 100% - 2

ANNEXES

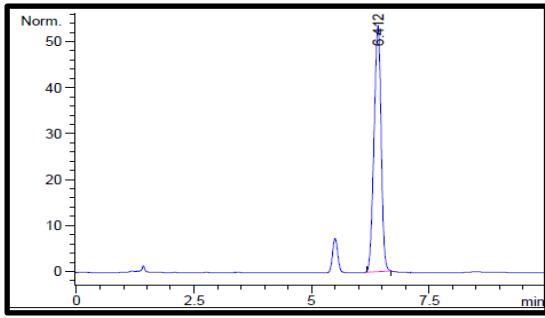


Figure 9. Chromatogramme principe actif 100% - 3

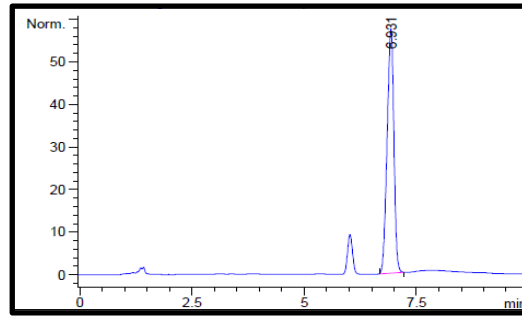


Figure 10. Chromatogramme principe actif 110% - 1

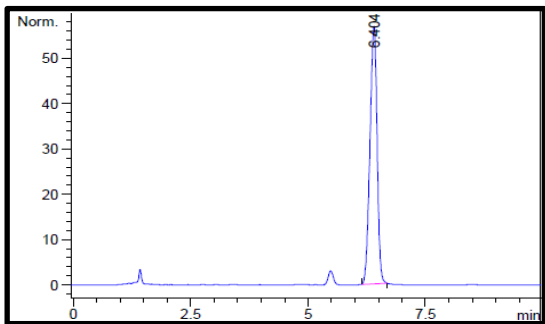


Figure 11. Chromatogramme principe actif 110% - 2

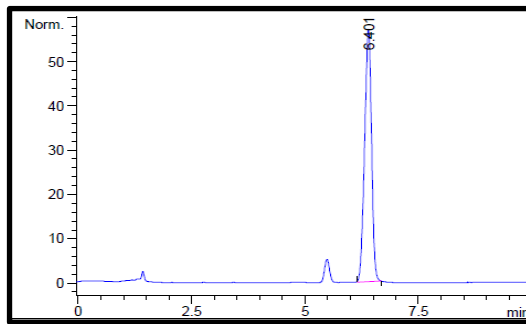


Figure 12. Chromatogramme principe actif 110% - 3

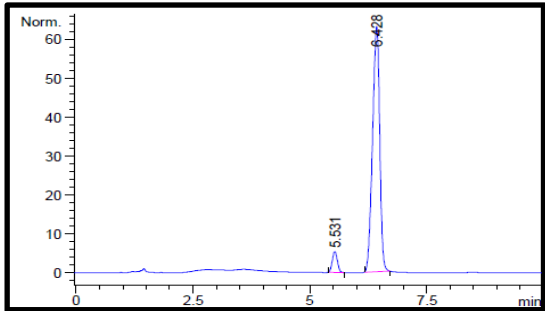


Figure 13. Chromatogramme principe actif 120% - 1

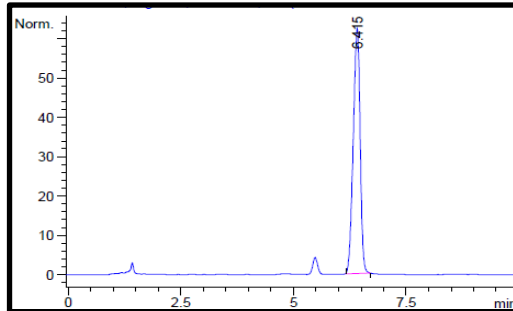


Figure 14. Chromatogramme principe actif 120% - 2

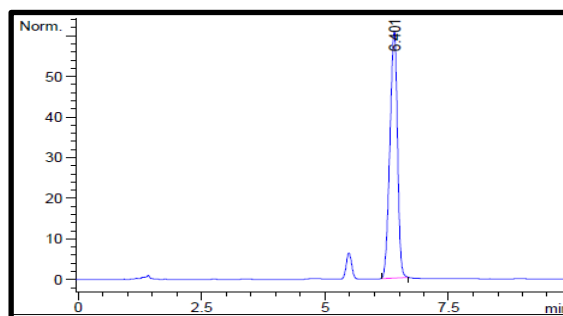


Figure 15 : Chromatogramme principe actif 120% - 3

ANNEXES

ANNEXES IV. Chromatogramme

ANNEXES IV.2. Forme reconstituée linéarité.

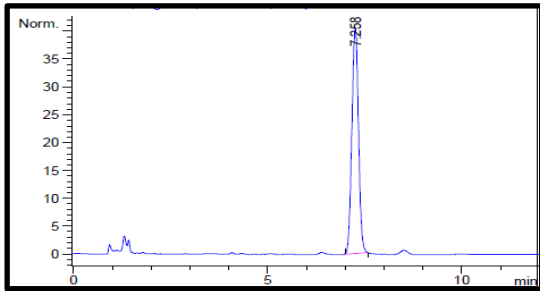


Figure 1 : Chromatogramme forme reconstituée 80% - 1

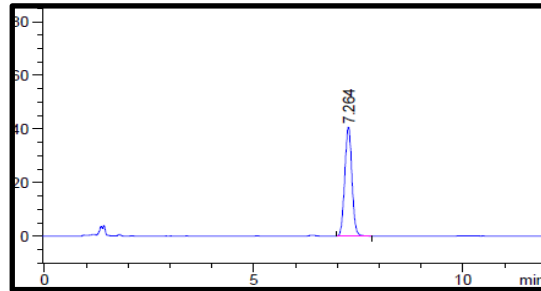


Figure 2 : Chromatogramme forme reconstituée 80% - 2

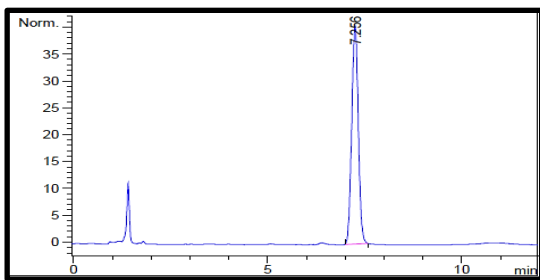


Figure 2 : Chromatogramme forme reconstituée 80% - 3

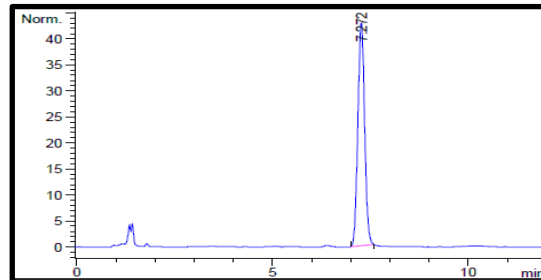


Figure 4 : Chromatogramme forme reconstituée 90% - 1

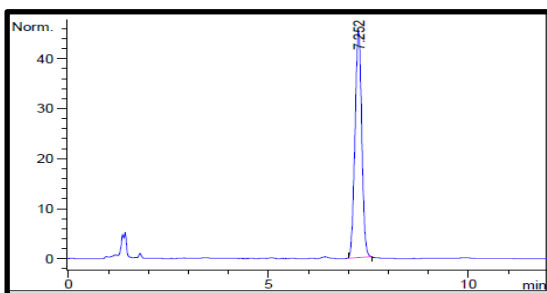


Figure 5. Chromatogramme forme reconstituée 90% - 2

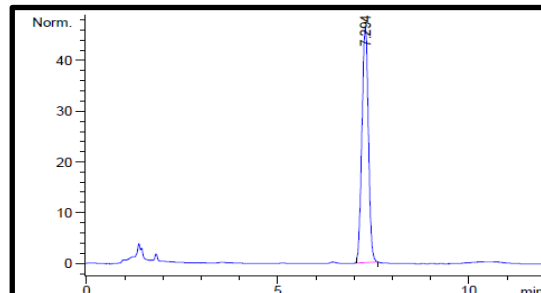


Figure 6. Chromatogramme forme reconstituée 90% - 3

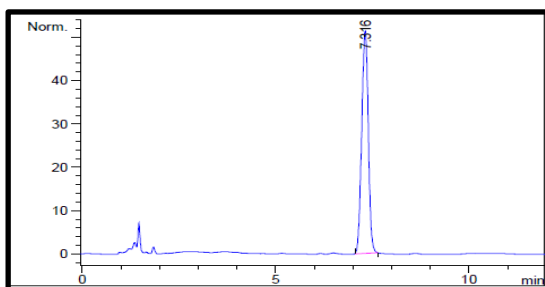


Figure 7. Chromatogramme forme reconstituée 100% - 1

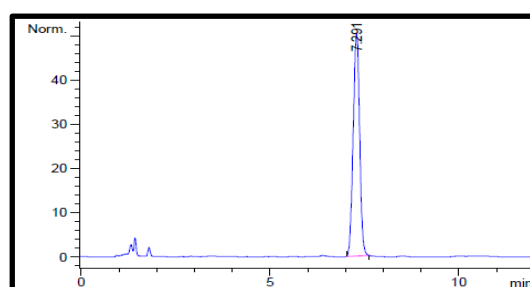


Figure 8 : Chromatogramme forme reconstituée 100% - 2

ANNEXES

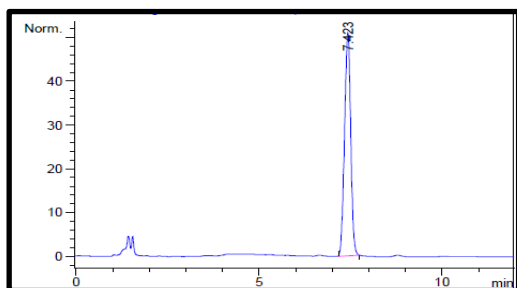


Figure 9. Chromatogramme forme reconstituée 100% - 3

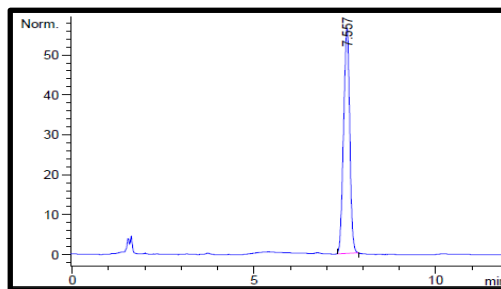


Figure 10. Chromatogramme forme reconstituée 110% - 1

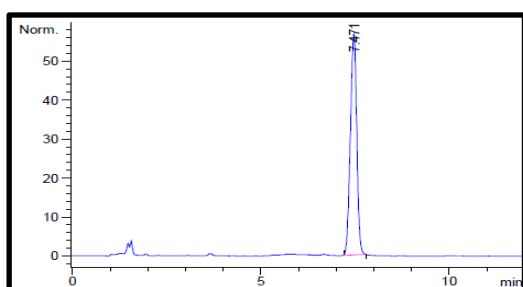


Figure 11. Chromatogramme forme reconstituée 110% - 2

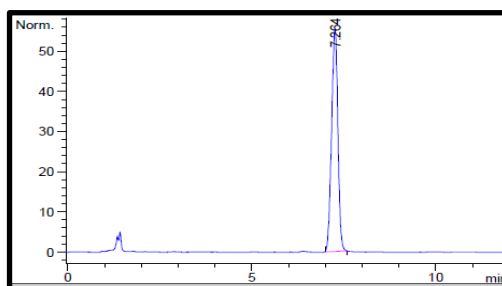


Figure 12. Chromatogramme forme reconstituée 110% - 3

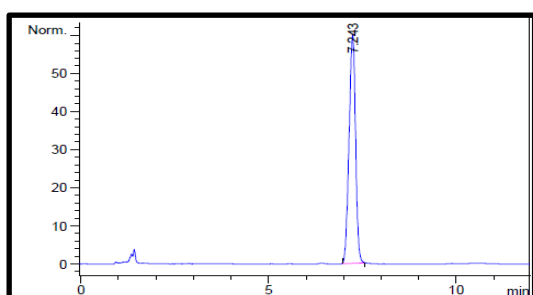


Figure 13. Chromatogramme forme reconstituée 120% - 1

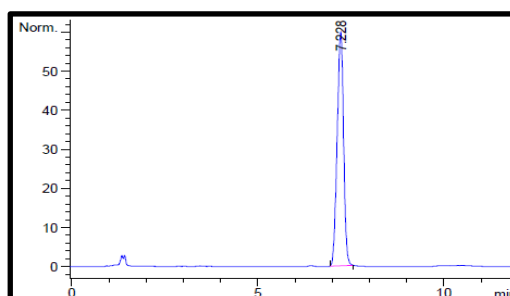


Figure 14. Chromatogramme forme reconstituée 120% - 2

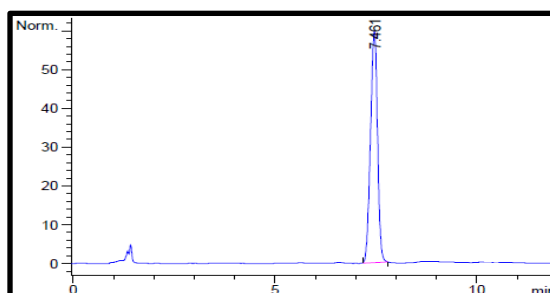


Figure 15. Chromatogramme forme reconstituée 120% - 3

ANNEXES

ANNEXES VI. Chromatogramme

ANNEXES VI.3. Répétabilité principe actif et forme reconstituée

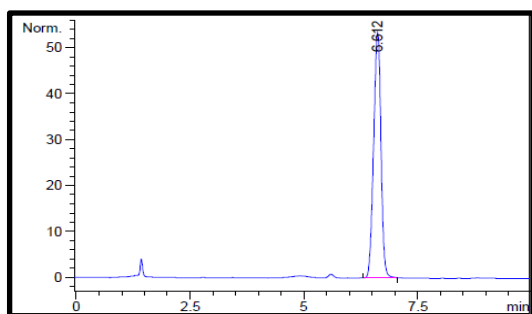


Figure 1. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (1^{ère} injection)

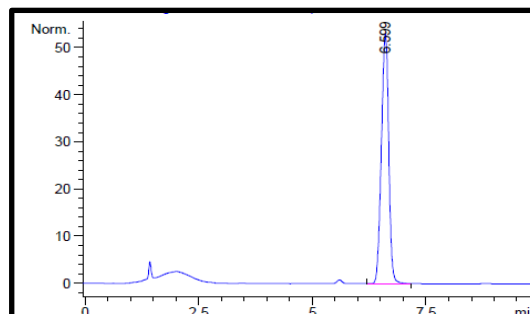


Figure 1. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (2^{ème} injection)

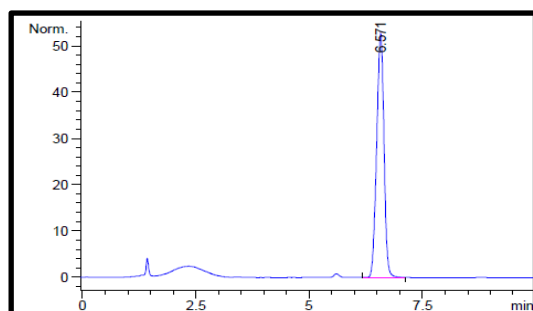


Figure 3. Chromatogramme principe actif – 100%-3 (1^{ème} injection)

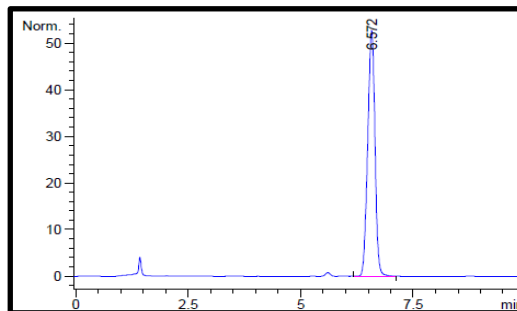


Figure 4. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (4^{ème} injection)

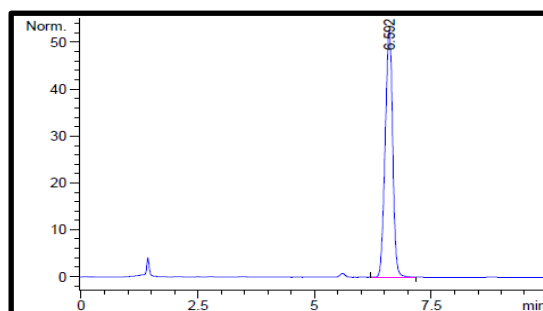


Figure 5. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (5^{ème} injection)

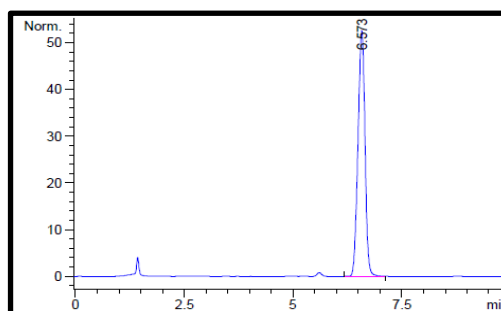


Figure 6. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (6^{ème} injection)

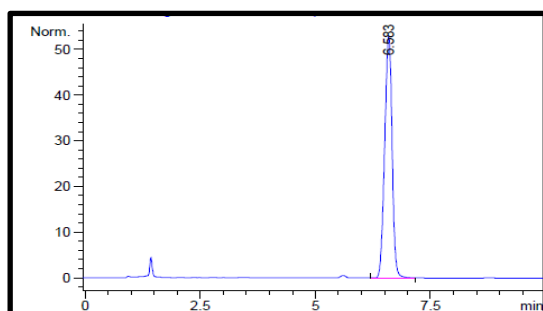


Figure 7. Chromatogramme principe actif – 100%-2 (1^{ère} injection)

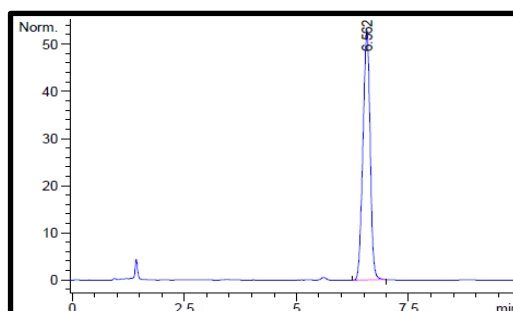


Figure 8. Chromatogramme principe actif – 100%-2 (2^{ème} injection)

ANNEXES

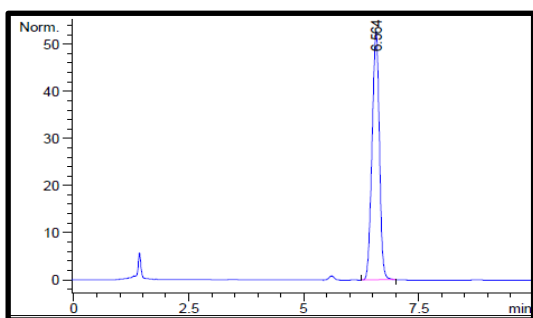


Figure 9. Chromatogramme principe actif – 100%-3 (1^{ère} injection)

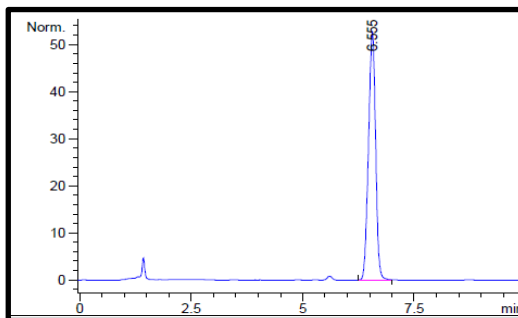


Figure 10. Chromatogramme principe actif – 100%-3 (2^{ème} injection)

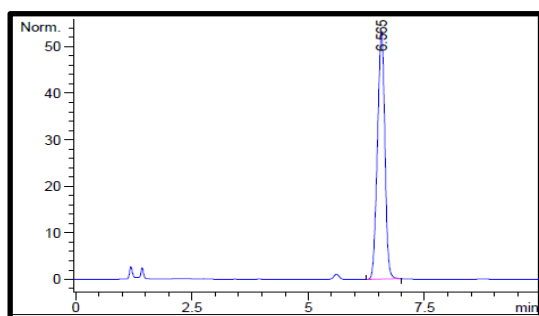


Figure 11. Chromatogramme principe actif – 100%-4 (1^{ère} injection)

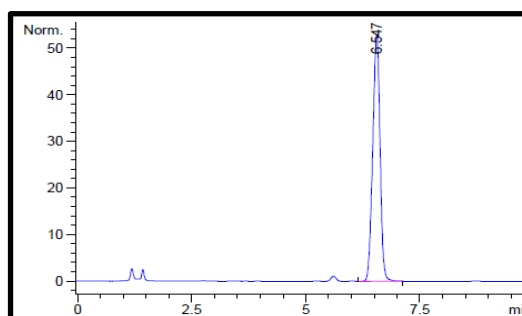


Figure 12. Chromatogramme principe actif – 100%-4 (2^{ème} injection)

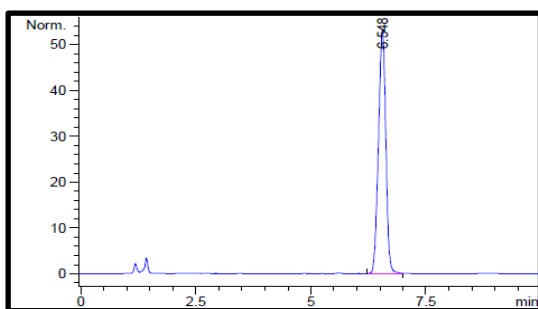


Figure 13. Chromatogramme principe actif – 100%-5 (1^{ère} injection)

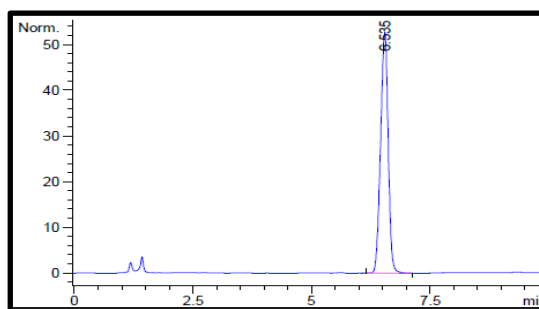


Figure 14. Chromatogramme principe actif – 100%-5 (2^{ème} injection)

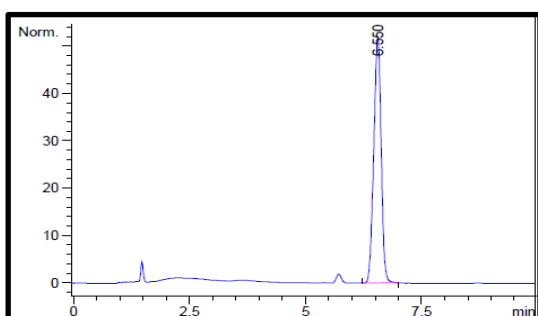


Figure 15. Chromatogramme principe actif – 100%-6 (1^{ère} injection)

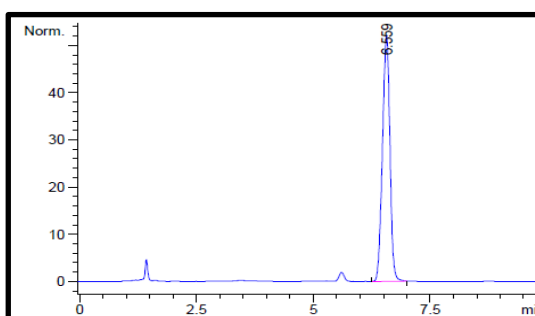


Figure 16. Chromatogramme principe actif – 100%-6 (2^{ème} injection)

ANNEXES

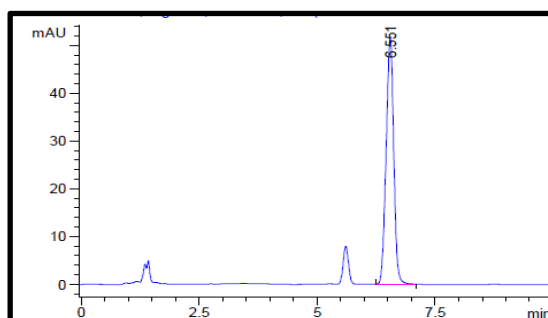


Figure 17. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-1 (1^{ère} injection)

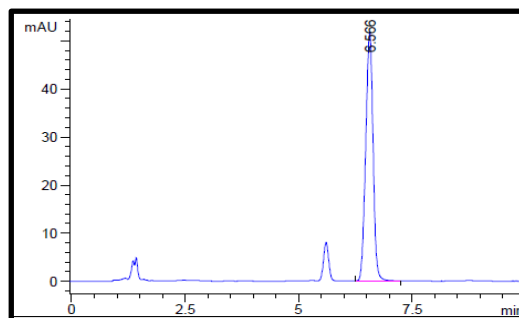


Figure 18. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-1 (2^{ème} injection)

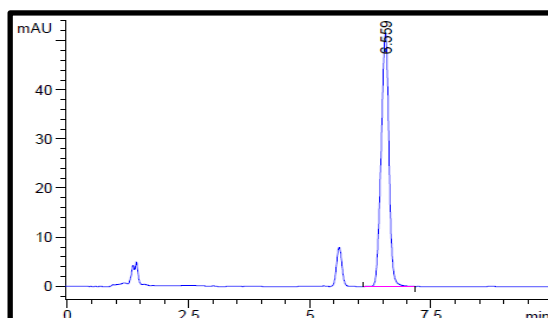


Figure 19. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-1 (3^{ème} injection)

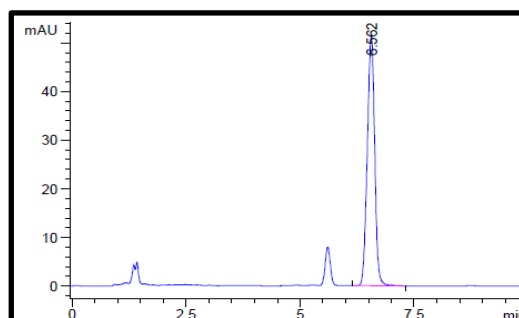


Figure 20. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-1 (4^{ème} injection)

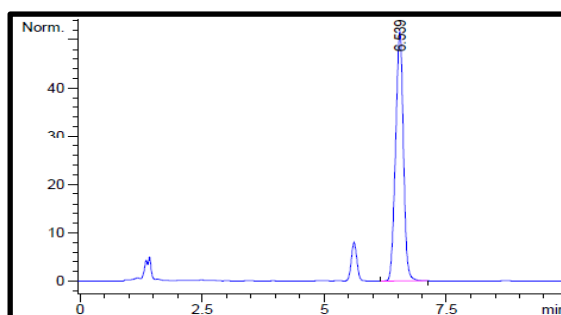


Figure 21. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-1 (5^{ème} injection)

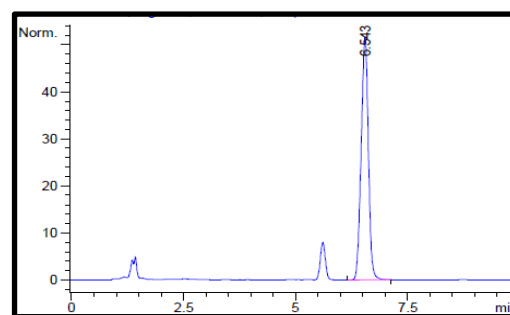


Figure 22. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-1 (6^{ème} injection)

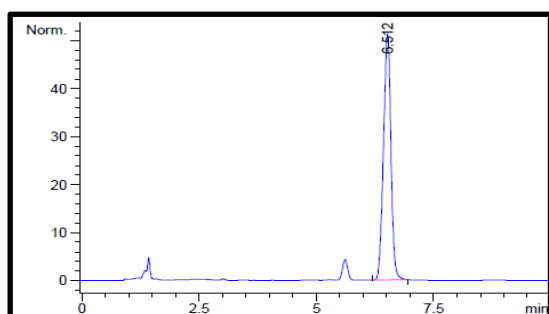


Figure 23. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-2 (1^{ère} injection)

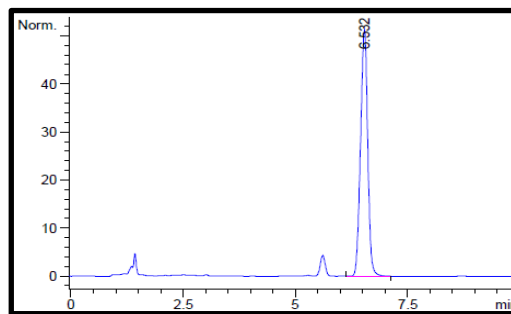


Figure 24. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-2 (2^{ème} injection)

ANNEXES

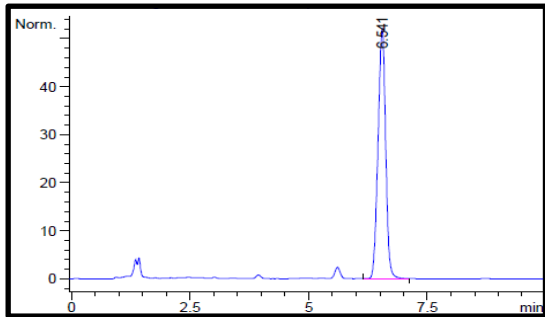


Figure 25. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-3 (1^{ère} injection)

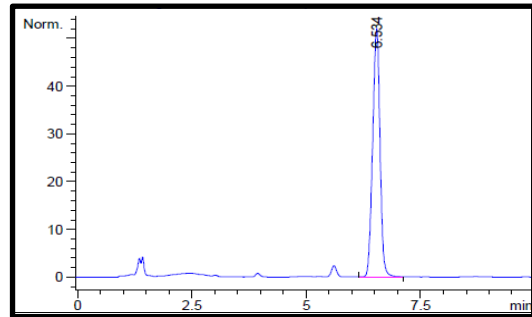


Figure 26. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-3 (2^{ème} injection)

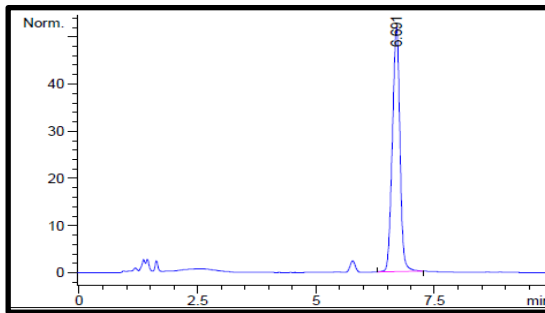


Figure 27. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-4 (1^{ère} injection)

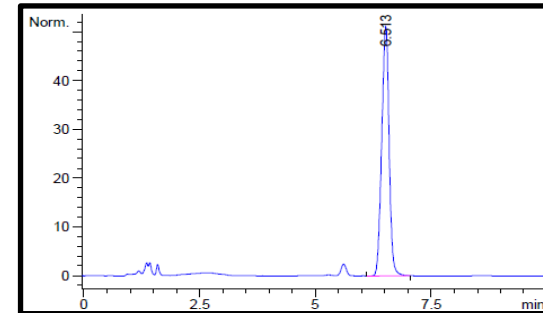


Figure 28. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-4 (2^{ème} injection)

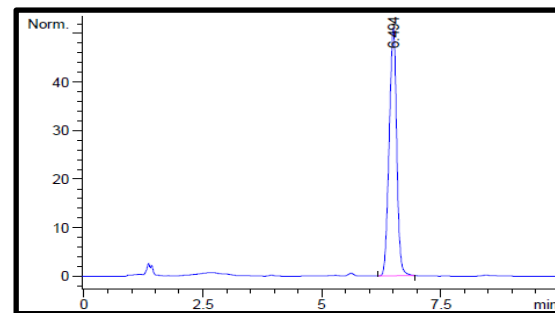


Figure 29. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-5 (1^{ère} injection)

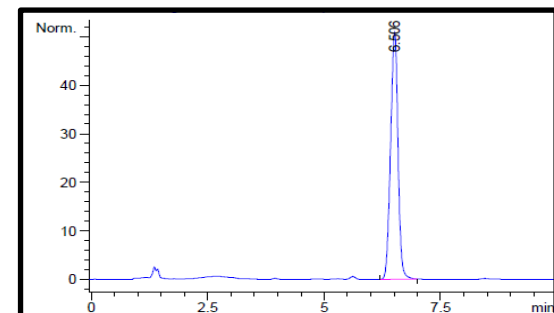


Figure 30. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-5 (2^{ème} injection)

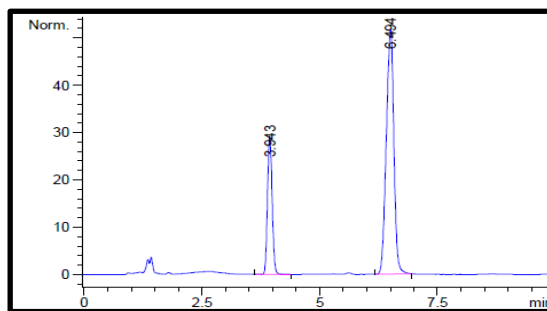


Figure 31. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-6 (1^{ère} injection)

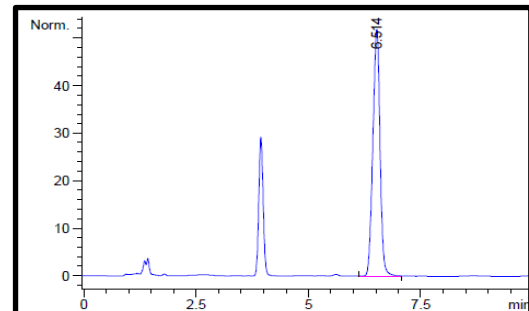


Figure 17. Chromatogramme forme reconstituée– 100%-6 (2^{ème} injection)

ANNEXES IV. Chromatogrammes

ANNEXES IV.4. Reproductibilité du principe actif et forme reconstituée

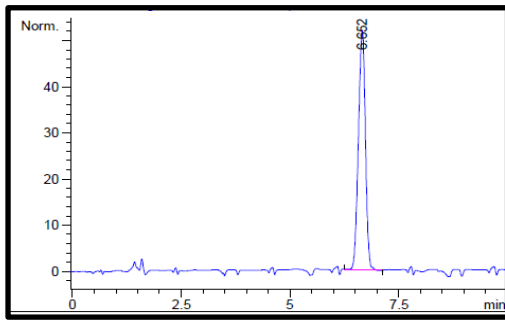


Figure 1. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (1^{ère} injection)

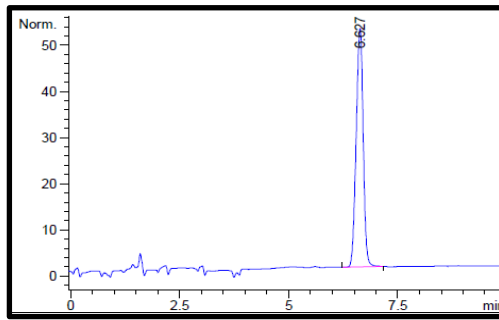


Figure 2. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (2^{ème} injection)

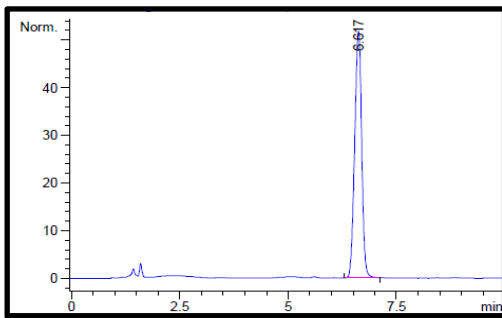


Figure 3. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (3^{ème} injection)

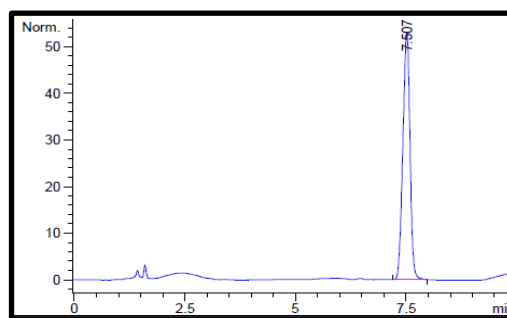


Figure 4. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (4^{ème} injection)

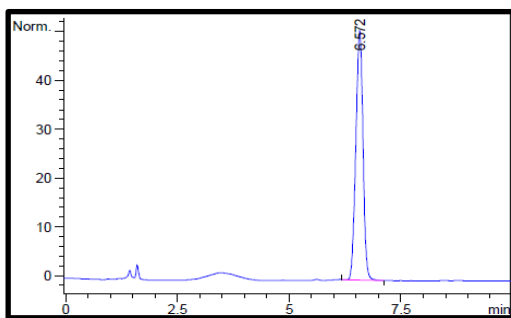


Figure 5. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (5^{ème} injection)

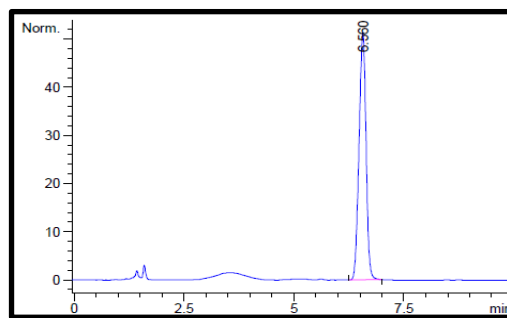


Figure 6. Chromatogramme principe actif – 100%-1 (6^{ème} injection)

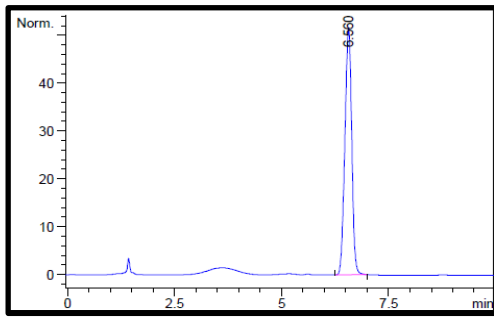


Figure 7. Chromatogramme principe actif – 100%-2 (1^{ère} injection)

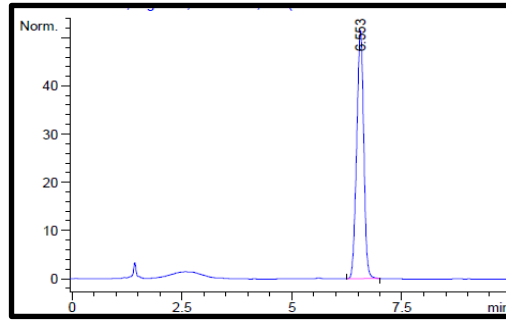


Figure 8. Chromatogramme principe actif – 100%-2 (2^{ème} injection)

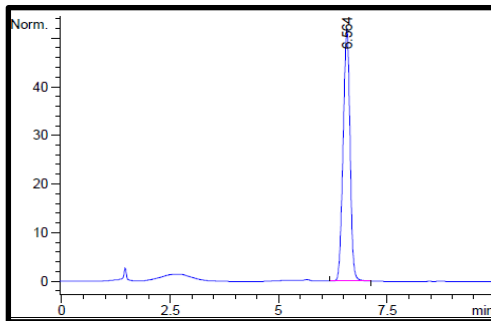


Figure 9. Chromatogramme principe actif – 100%-3 (1^{ère} injection)

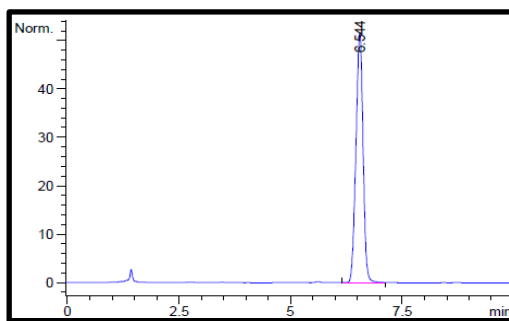


Figure 10. Chromatogramme principe actif – 100%-3 (2^{ème} injection)

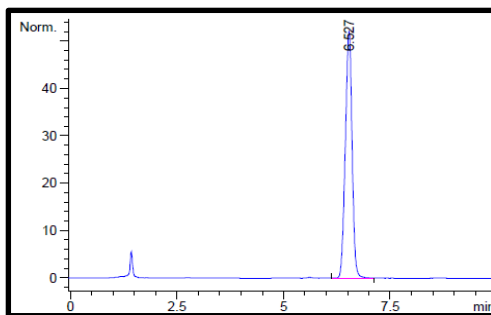


Figure 11. Chromatogramme principe actif – 100%-4 (1^{ère} injection)

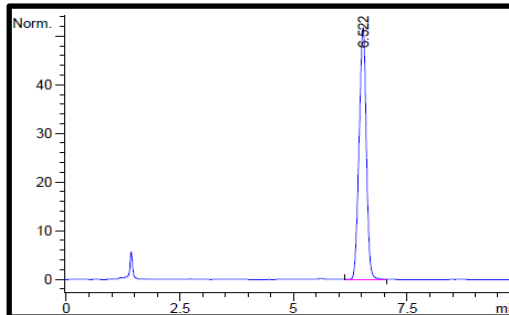


Figure 12. Chromatogramme principe actif – 100%-4 (2^{ème} injection)

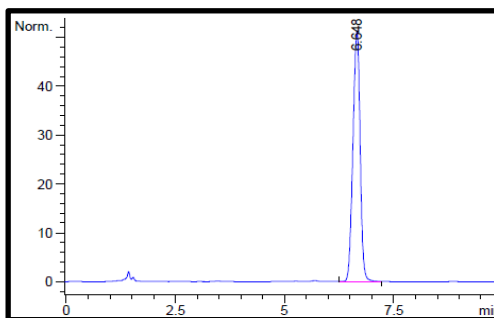


Figure 13. Chromatogramme principe actif – 100%-5 (1^{ère} injection)

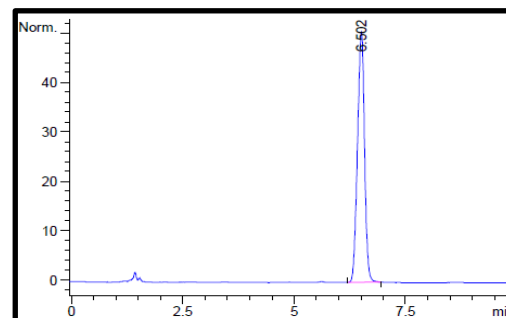


Figure 14. Chromatogramme principe actif – 100%-5 (2^{ème} injection)

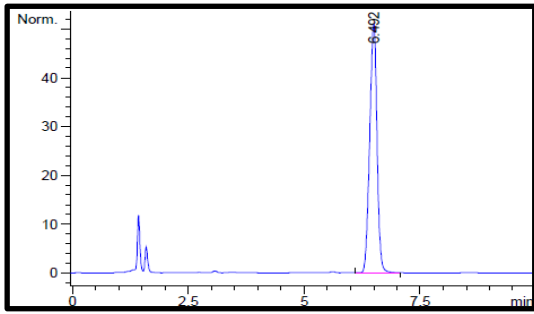


Figure 15. Chromatogramme principe actif – 100%-6 (1^{ère} injection)

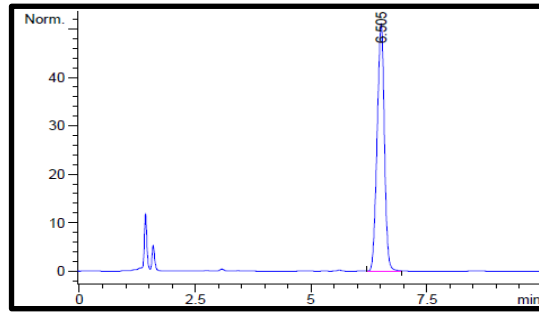


Figure 16. Chromatogramme principe actif – 100%-6 (2^{ème} injection)

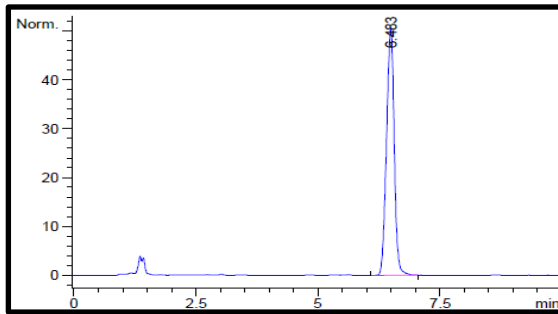


Figure 17. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-1 (1^{ère} injection)

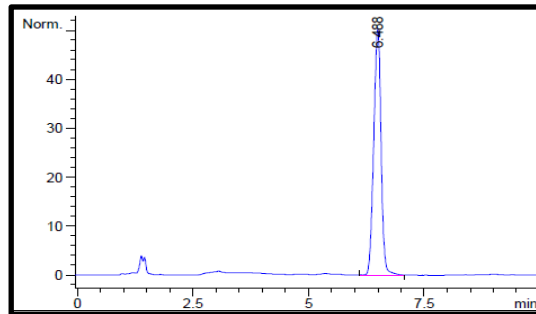


Figure 18. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-1 (2^{ème} injection)

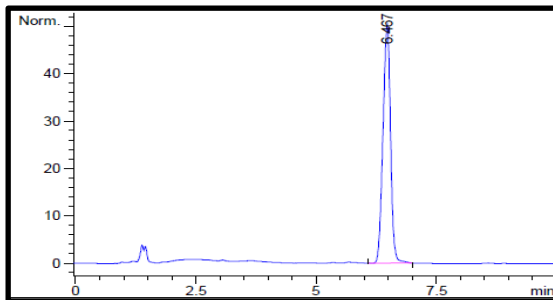


Figure 19. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-1 (3^{ème} injection)

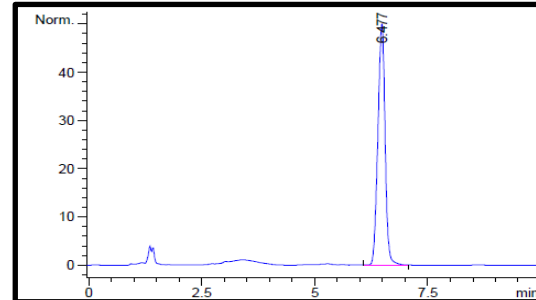


Figure 20. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-1 (4^{ème} injection)

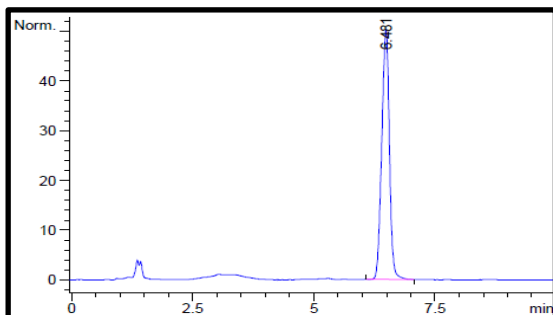


Figure 21. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-1 (5^{ème} injection)

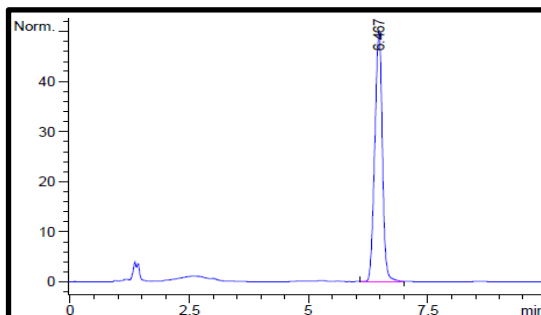


Figure 22. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-1 (6^{ème} injection)

ANNEXES

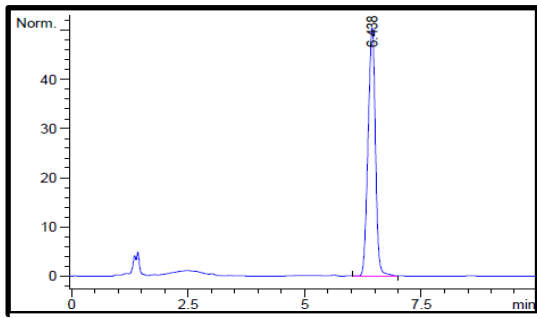


Figure 23. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-2 (1^{ère} injection)

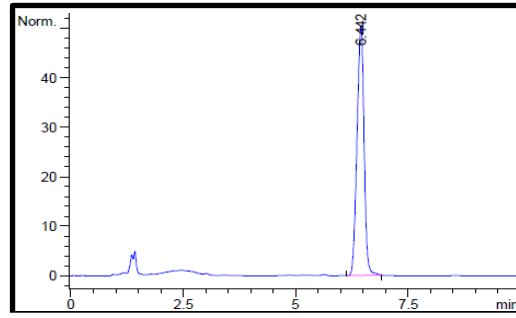


Figure 24. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-2 (2^{ème} injection)

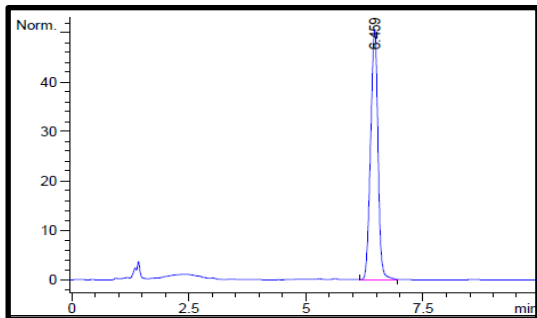


Figure 25. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-3 (1^{ère} injection)

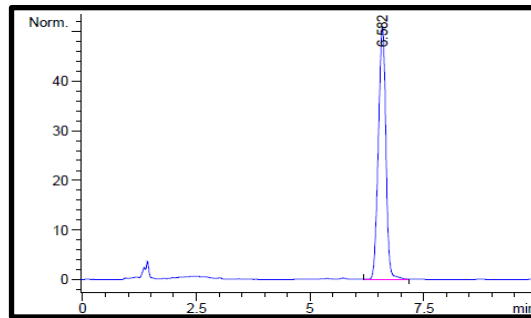


Figure 26. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-3 (2^{ème} injection)

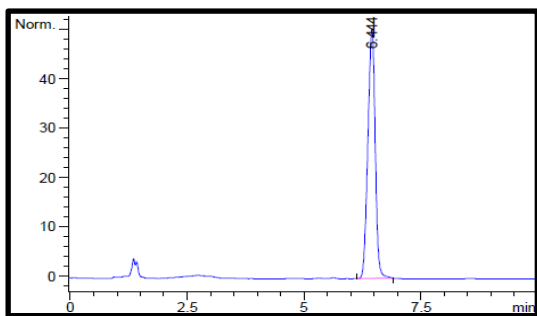


Figure 27. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-4 (1^{ère} injection)

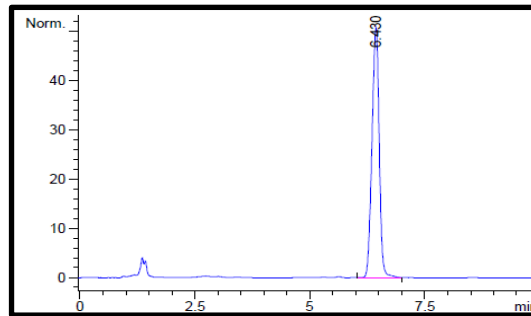


Figure 28. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-4 (2^{ème} injection)

ANNEXES

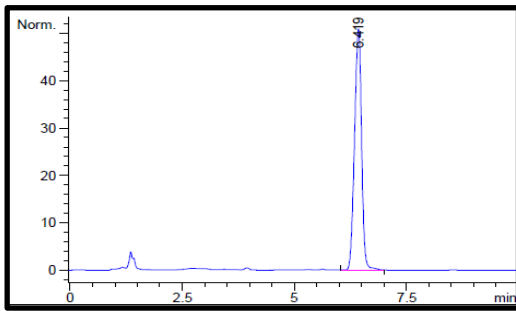


Figure 29. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-5 (1^{ère} injection)

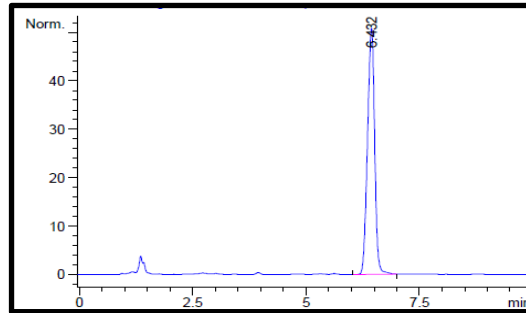


Figure 30. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-5 (2^{ème} injection)

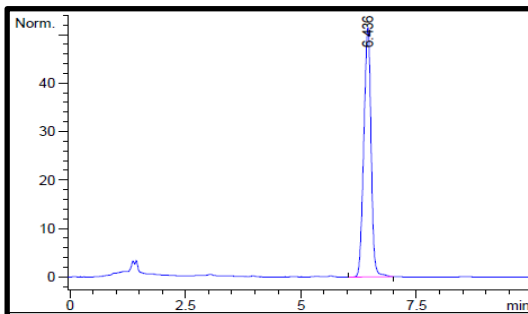


Figure 31. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-6 (1^{ère} injection)

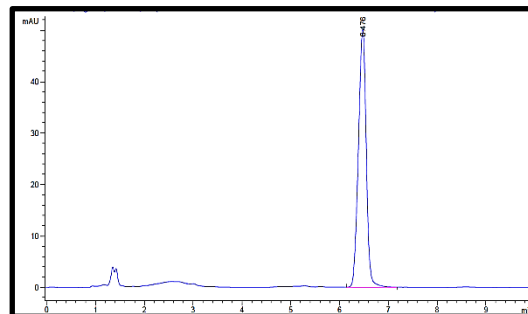


Figure 32. Chromatogramme forme reconstituée – 100%-6 (2^{ème} injection)

ANNEXES

ANNEXES V. Formules de calcul

1. Facteur de symétrie

$$A_s = \omega_{0.05} / 2d$$

⇒ **A_s** : facteur de symétrie

⇒ **d** : Distance entre le perpendiculaire abaissé du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur

⇒ **W_{0.05}** : Largeur du pic au vingtième de sa hauteur.

2. Conformité du système

Recouvrement de la préparation des Standards :

$$R\% = \frac{S_{std1} \times Pe_{std2} \times 100}{S_{std2} \times Pe_{std1}}$$

⇒ **S_{std1}** : moyenne des surfaces des 5 injections de la solution standard « 1 ».

⇒ **Pe_{std2}** : prise d'essai de la solution standard « 2 » en mg.

⇒ **S_{std2}** : moyenne des surfaces des 3 injections de la solution standard2.

⇒ **Pe_{std1}** : prise d'essai de la solution standard1 en mg.

2. Linéarité :

2.1-Le coefficient de corrélation de la droites D : r

$$r = \frac{SPE(x,y)}{\sqrt{SCE_x} \times \sqrt{SCE_y}}$$

Avec:

$$SPE(x, y) = N \times COV(x, y)$$

$$COV(x, y) = \frac{\sum[(x_{ij} - M_{xij}) \times (y_{ij} - M_{yij})]}{N}$$

$$SCE(x) = \sum(x_{ij} - M_{xij})^2$$

$$SCE(y) = \sum(y_{ij} - M_{yij})^2$$

ANNEXES

$$Mx_{ij} = \frac{1}{N} \sum x_{ij}$$

$$My_{ij} = \frac{1}{N} \sum y_{ij}$$

2.2-L'équation de la droite est de la forme $y = bx + a$

2-2.1 Détermination de la pente (b):

$$b = \frac{SPE(x,y)}{SCE_x}$$

⇒ **b** : la pente

2-2.2 Détermination de l'ordonnée à l'origine (a) :

$$a = \frac{\sum y_{ij} - b \sum x_{ij}}{N}$$

⇒ **a** : ordonnée à l'origine

3. Exactitude

3.1. Détermination de la quantité trouvée :

$$y = a X_2 + b \longrightarrow X_2 = \frac{y-b}{a}$$

3.2. Exactitude individuelle en % :

$$E \% = \frac{X_2 \times 100}{X_1}$$

X₁ : Valeur introduite

X₂ : Valeur indéterminé

3.3. La moyenne de l'exactitude

$$E = \sum E \%$$

ANNEXES

3.4. Le Recouvrement :

R =Quantité retrouvée X 100/Quantité introduite

4. Fidélité

4.1. L'écart type

$$\partial = \frac{\Sigma(y_{ij} - M_{ij})}{N - 1}$$

4.2. Le coefficient de variation :

$$CV\% = \frac{\partial \cdot 100}{M_{y_{ij}}}$$

⇒ **M_{y_{ij}}** : Moyenne des surfaces.

Résumé

L'objectif de ce travail est la mise au point d'une méthode de dosage d'AZITHROMYCINE dans sa forme pharmaceutique « comprimé enrobé 500mg » par HPLC-UV selon les recommandations d'USP. Les effets du débit, pH, pourcentage en solvant organique, température et la marque de la colonne sur le temps de rétention (Tr), facteur de symétrie (As) et nombre de plateaux théoriques (Nth) ont été étudiés. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne de marque Merck C18 (150 mm * 4,6 mm et une granulométrie de 5 µm) à 40°C à 210nm avec une phase mobile constituée d'acétonitrile-tampon phosphate K₂HPO₄ (65:35, v/v) de pH 7,5 et à débit 1ml /min. La méthode s'est avérée linéaire dans une gamme de concentration de 80% à 120%. Les coefficients de corrélation (R²) des équations de régression sont supérieurs à 0,999. La précision de la méthode a été démontrée par les valeurs des coefficients de variation inférieurs à 2%. Aucune interférence des excipients ou des produits de dégradation d'une formulation pharmaceutique n'a été observée. Selon les résultats de la validation, la méthode proposée est simple, spécifique, linéaire, précise, exacte et peut être appliquée à l'analyse du médicament «AZITHROMYCINE» avec un excellent taux de recouvrement.

Mots-clés: AZITHROMYCINE, HPLC, dosage, validation.

Abstract

The main aim of this work is the development of dosage method for the « AZYTHROMYCIN » in his pharmaceutical state « 500mg coated tablets» by HPLC-UV as recommended by the USP guideline. The effects of the debit, PH, the pourcentage of organic solvent, the temperature and the effect of the column on the retention time (Tr), the symmetry factor (As) and the amount of theoretical platforms (Nth) have been studied. The chromatographic separation has been realized on a Merck C18 column (150mm* 4,6mm and a 5µm granulometry) at 40°C and 210nm along side with a mobile phase made up of a phosphate-buffered acetonitrile K₂HPO₄ (65 :35, v/v) with a pH of 7,5 and a debit of 1ml/min. The method is linear when the concentration is ranged between 80% and 120%. The correlations coefficients (R²) of the regression equations are higher than 0,999. The precision of the method is proven by the values of the variation coefficients which are lower than 2%. No interference of excipient or degradation products of a pharmaceutical formation has been noticed. According to the results of the validation, the proposed method is simple, specific, precise and correct and it can be used for the analysis of the “AZYTHROMYCIN” with an excellent recovery rate.

Key words: AZITHROMYCIN , dosage, validation.