

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERRI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIÈRE

FILIERE : CHIMIE

MÉMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

Etude de stabilité du répaglinide dans des conditions de dégradation forcée suivie d'une étude de stabilité accélérée sur le produit fini « Novonorm 0.5 mg, comprimés non enrobés ».

Présenté par : **Amrani Fatma** et **Yassa Yamina**

Le **11/10/2021,** *devant le Jury composé de :*

<i>Mamou</i>	<i>Marzouk</i>	<i>MCA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>PRESIDENT</i>
<i>Belmahdi</i>	<i>Lila</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>ENCADRANT</i>
<i>Semmani</i>	<i>Djamel</i>	<i>QC SP</i>	<i>LMTO</i>	<i>CO-ENCADRANT</i>
<i>Khaldi</i>	<i>Nassima</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>EXAMINATEUR</i>

REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent d'abord à notre promotrice, Mme Belmahdi lila et notre Co-promoteur, Mr Semmani Djamel. Nous leur demeurerons toujours reconnaissantes pour leur disponibilité, leur inlassable rappel à la rigueur et leur dévouement à la science.

Nous tenons également à remercier la responsable du laboratoire LMTO, Melle Hasdane Nassima, pour nous avoir fait confiance et accepté de nous accueillir dans des conditions tout à fait satisfaisantes, en stage pratique.

Tout le personnel du laboratoire LMTO s'est montré dévoué et nous a apporté une précieuse aide tout au long de ce stage, en particulier Lynda et Mustapha. Nous les remercions tous de bon cœur et les assurons ici de notre vive reconnaissance.

Grand merci également aux ingénieurs des laboratoires pédagogiques de chimie pharmaceutique et chimie des surfaces et catalyse de la faculté des sciences de l'UMMTO pour leur laborieuse assistance.

Nous n'oublierons pas de remercier Mr Mamou Marzouk, président du jury et lui rendre hommage du fait qu'il nous honore de présider à notre intention ce jury ainsi que Mme Khaldi Nassima pour sa généreuse disponibilité à examiner notre travail et sa clairvoyante expertise.

Enfin, nos tendres remerciements à Mr Yassa Makhoulf, qui a relu et corrigé notre mémoire, ses conseils de rédaction ont été précieux.

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A la mémoire de mon regrettable père !

A Ma Chère Mère :

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour sa patience, son soutien, son amour, ses sacrifices, toute son assistance durant tant d'années et pour ce qu'elle a fait pour que je puisse arriver à ce stade.

A mes chères sœurs Sadia, Djouher et Dehbia qui ont toujours été à mes côtés, Merci à vous de m'avoir écoutée, fortifiée et comprise.

A mes chers frères Sofiane et Ali qui ont toujours été à mes côtés, Merci.

A mes petits neveux et nièces : Ahlame, Aida, Mohamed, Zineddine et Daniel qui sont pour moi une source de bonheur.

A mon très cher Farid que dieu te protège pour moi.

A mes chers grands parents, mes cousins et cousines, mes tantes et oncles.

A mes chères copines et sœurs Hiba, Wahiba, Amel, Kahina, Fatima, Lynda, Malika, Déhia, Karima et Safia qui sont pour moi et une incroyable découverte . En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

A mon binôme YAMINA

Avec qui j'ai passé des moments inoubliables durant la préparation de ce projet de fin d'étude ainsi qu'à toute sa famille.

Fatma

DEDICACES

Je dédie ce mémoire de fin d'études :

A la mémoire de mon grand frère Mohand Ouidir qui m'a malheureusement privé du réconfort de sa présence et de son insouciance gaieté.

A mon père, ma mère, mes frères et sœurs Said, Nadia et kahina

Qui, tout au long de mes études, m'ont apporté un indéfectible soutien et un chaleureux réconfort.

A Massi qui m'a soutenu et encouragé tout au long de mes études.

A mon amie Lydia avec qui je partage une affectueuse tendresse et tant d'années de besogne, de souffrance et de joie.

A mon binôme Fatma avec qui je partage ce laborieux et passionnant travail de mémoire.

Yamina

SOMMAIRE

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des unités

Introduction..... 1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Présentation du site LMTO et du produit

1.1 Présentation du site LMTO (Local Manufacturing Tizi-ouzou) 3

1.2 Présentation du Répaglinide 0.5mg, produit fini 3

1.2.1 Nomenclature et structure chimique 4

1.2.2 Stéréochimie 4

1.2.3 Propriétés physico-chimiques du Répaglinide 4

1.2.4 Impuretés du Répaglinide 5

Chapitre 2 : Etude de la stabilité des médicaments

2.1 Stabilité d'un médicament 7

2.2 Objectif de l'étude de stabilité 7

2.3 Conditions pour lesquelles une étude de stabilité est exigée 8

2.4 Facteurs influençant la stabilité des médicaments 8

2.4.1 Facteurs extrinsèques 9

2.4.2 Facteurs Intrinsèques 10

2.4.3 Autres facteurs 11

2.5 Directives internationales 11

2.6 La date de péremption 11

2.7 Types d'études de stabilités 13

2.7.1	Etude de stabilité dans les conditions réelles (à long terme)	13
2.7.2	Etude de stabilité dans les conditions intermédiaires	14
2.7.3	Etude de stabilité dans les conditions accélérées	14
2.7.4	Etude de stabilité dans les conditions de stress	15
2.8	Conditions de réalisation d'une étude de stabilité (Cas d'un produit fini)	20
2.9	Gestion des études de stabilité au niveau du site LMTO	20
2.10	Tests à réaliser pour une étude de stabilité : Cas d'une forme orale solide	23
2.10.1	Aspect	23
2.10.2	Test d'identification	23
2.10.3	Dosage	23
2.10.4	Perte a la dessiccation	23
2.10.5	Test de dissolution	24
2.10.6	Test de dureté ou de résistance à la rupture	24
2.10.7	Test d'uniformité de masse	24
2.10.8	Test d'uniformité de teneur	24
2.10.9	Test de limites microbiennes.....	24

Partie expérimentale :

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1	Matériel	27
3.2	Méthodes	29
3.2.1	Etude de la dégradation forcée du Répaglinide	29
3.2.2	Etude de la stabilité de Novonorm 0.5mg, dans les conditions accélérées	32
3.2.2.1	Aspect	32
3.2.2.2	Test de dureté (la résistance à la rupture)	32
3.2.2.3	Test de perte à la dessiccation (LOD)	33
3.2.2.4	Identification du Répaglinide par HPLC	33
3.2.2.5	Dosage du principe actif et des impuretés	34

3.2.2.6	Test de dissolution	40
3.2.2.7	Test de pureté microbienne	45
Chapitre 4 : Résultats et discussions		
4.1	Etude de la dégradation forcée du Répaglinide	46
4.1.1	Dégradation Acide	46
4.1.2	Dégradation neutre	46
4.1.3	Dégradation oxydative	47
4.1.4	Dégradation photolytique	48
4.1.5	Dégradation basique et thermique	50
4.1.6	Discussion	51
4.2	Étude de la stabilité de Novonorm 0.5mg dans les conditions accélérées	51
4.2.1	Aspect	51
4.2.2	Test de dureté	52
4.2.3	Perte à la dessiccation (LOD)	52
4.2.4	Identification, dosage du principe actif et des impuretés	53
4.2.5	Dosage des impuretés	53
4.2.6	Test de dissolution	56
4.2.7	Test de la pureté microbienne	58
4.3	Tendances des analyses de l'étude de stabilité accélérée (T0, T3, T6)	58
Conclusion générale		62
Références bibliographiques		
Annexes		

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM : autorisation de mise sur le marché.

AQ : assurance qualité.

BPF : bonnes Pratiques de Fabrication.

CCM : chromatographie sur couche mince.

Cp : comprimé(s).

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

CQ : contrôle qualité.

DGAT : dénombrement de germes aérobies mésophiles viables totaux.

DLMT : dénombrement des levures et moisissures totales.

E. coli : *Escherichia coli*.

FDA : food and drug administration

FR : facteur de retardement.

HEPT : hauteur équivalente à un plateau théorique.

HR : humidité relative.

HPLC : chromatographie en phase liquide haute performance.

ICH : international conference of harmonization.

IR : infrarouge.

IUPAC : international union of pure and applied chemistry.

LMTO : local manufacturing Tizi-Ouzou.

LQC : laboratoire de contrôle qualité.

LOD : low of draying

ISO : international standard organization.

MPPBA : (1S)-3-Méthyl-1-[2-(Pipéridin-1-yl) Phényl] Butan-1-Amine

OMS : organisation mondiale de la santé.

USP 44 : united states pharmacopeia 2021.

PA : principe (s) actif (s).

RMN : spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.

rpm : rotations par minute.

RSD : relatif standard déviation (écart type relatif).

RS : référence standard (le standard de référence).

STD : standard.

t : temps.

UV : ultra-violet.

LISTE DES FIGURES

Figure N°1 : structure chimique du répaglinide	4
Figure N°2 : organigramme de la gestion de l'étude de stabilité au niveau du site LMTO	21
Figure N°3 : échantillon du répaglinide en suspension dans l'eau porté à reflux	30
Figure N°4 : solution oxydante contenant du répaglinide au bain-marie	30
Figure N°5 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par HCl à 0.5N	46
Figure N°6 : chromatogramme de la solution du répaglinide porté à reflux	47
Figure N°7 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par le peroxyde d'hydrogène à 30%	48
Figure N°8 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par une lumière UV	49
Figure N°9 : image photographiée de l'aspect de l'échantillon du répaglinide avant (a) et après (b) dégradation par une lumière UV	49
Figure N°10 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par une base	50
Figure N°11 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par la chaleur	50
Figure N°12 : image photographiée des 2 faces et du côté du Cp Novonorm 0.5 mg	52
Figure N°13 : les 6 chromatogrammes correspondant aux 6 injections de la STD3	54
Figure N°14 : chromatogramme de la solution SST	54
Figure N°15 : chromatogramme de la solution échantillon	55
Figure N°16 : chromatogramme de la solution échantillon 1	57
Figure N°17 : tendance du test de dureté	59
Figure N°18 : tendance du test de perte à la dessiccation	59
Figure N°19 : tendance du test de dosage	60

Figure N°20 : tendance du test de dosage des impuretés	61
Figure N°21 : tendance du test de dissolution	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°1 : propriétés physicochimiques et organoleptiques du Répaglinide	5
Tableau N°2 : structures et nomenclatures des impuretés du répaglinide	5
Tableau N°3 : caractéristiques des différentes zones climatiques selon l’OMS	14
Tableau N°4 : conditions de stockage, périodes et fréquences des analyses	15
Tableau N°5 : co-solvants organiques utilisés dans les études de stress	17
Tableau N°6 : programme d’étude de stabilité accéléré et les différents tests réalisés	26
Tableau N°7 : les conditions chromatographiques utilisées dans l’étude de dégradation forcée du répaglinide	29
Tableau N°8 : séquences d’injections appliquées dans l’étude de dégradation forcée du répaglinide	29
Tableau N°9 : nombre de Cp prélevés pour chaque essai	32
Tableau N°10 : les conditions chromatographiques dans l’essai de dosage du Répaglinide et des impuretés	36
Tableau N°11 : séquence d’injections dans l’essai de dosage du répaglinide	36
Tableau N°12 : séquence d’injections dans l’essai de dosage des impuretés du répaglinide	36
Tableau N°13 : conformité du système chromatographique dans l’essai du dosage du répaglinide et des impuretés	39
Tableau N°14 : conditions opératoires du test de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg	42
Tableau N°15 : conditions chromatographiques dans le test de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg	43

Tableau N°16 : séquence d'injections dans le test de dissolution des Cp Novonorm 0.5 mg	43
Tableau N°17 : critères d'acceptation pour chaque niveau de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg	44
Tableau N°18 : conformité du système chromatographique dans l'essai de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg	44
Tableau N°19 : taux des impuretés après dégradation à pH acide	46
Tableau N°20 : taux des impuretés après une dégradation neutre	47
Tableau N°21 : taux des impuretés après une dégradation oxydative	48
Tableau N°22 : taux des impuretés après une dégradation par lumière UV	49
Tableau N°23 : résultats du contrôle de l'aspect des 20 Cp de Novonorm 0.5 mg	51
Tableau N°24 : résultat du test de dureté (en Newton) à T0, T3 et T6	52
Tableau N°25 : résultat du test de perte à la dessiccation à T0, T3 et T6	52
Tableau N°26 : résultat du test de dosage du répaglinide à T0, T3 et T6	53
Tableau N°27 : résultat du test de dosage des impuretés du Répaglinide	53
Tableau N°28 : temps de retentions et aires des pics de la solution SST	55
Tableau N°29 : temps de retentions et aires des pics de la solution échantillon	55
Tableau N°30 : taux des impuretés dans la solution échantillon à T6	56
Tableau N°31 : résultat du test de dissolution à T0, T3 et T6	56
Tableau N°32 : temps de rétention et aires des pics des 6 échantillons analysés	57
Tableau N°33 : résultats des tests microbiologiques	58

LISTE DES UNITES

°C : degré Celsius.

cm : centimètre.

cfu/g : unité format colonie par gramme.

g/mol : gramme par mole.

Kg : kilogramme.

µg : microgramme.

mg : milligramme.

mL : millilitre.

µL : microlitre.

M : mole(s) par litre.

min : minute.

mm : millimètre.

m³ : mètre cube.

nm : nanomètre.

N : Newton.

pa : pascalle.

wh/m² : watt par mètre carré.

% : pour cent.

Introduction

Introduction

L'industrie pharmaceutique est, dans le monde entier, un élément important des systèmes de santé. Elle comprend de nombreux services et entreprises publics ou privés qui découvrent, mettent au point, recherchent, fabriquent et commercialisent des médicaments au service de la santé humaine et animale. Elle est principalement fondée sur la recherche et le développement de médicaments. C'est l'une des industries les plus importantes économiquement dans le monde. Elle reste un secteur clé et un important moteur de croissance de l'économie mondiale.

Les médicaments sont des produits sensibles. L'humidité, la lumière ou une température de conservation trop élevée ou trop basse peuvent influencer leur qualité ; il peut en résulter une diminution, voire une perte de l'efficacité ou une atteinte à la santé par des produits de dégradation.

Afin de garantir l'efficacité, la sécurité et la qualité d'un médicament, des études de stabilité doivent être menées. Ces études peuvent être réalisées sur le principe actif et sur le produit fini, elles peuvent être menées dans des conditions accélérées, intermédiaires ou réelles. Leur but est d'apporter la preuve de la manière dont évolue la qualité d'un médicament au fil du temps sous l'influence d'un certain nombre de facteurs extérieurs. Les données obtenues à partir de ces études permettent de déduire la durée et les conditions de conservation, qui constituent deux paramètres importants dans la sécurité d'utilisation d'un médicament.

En plus des études de stabilité citées précédemment, l'étude de la dégradation forcée joue également un rôle très important dans l'évaluation de la stabilité d'un médicament. Elle nous permet de maîtriser sa formulation et de déterminer les conditions optimales de son stockage puisqu'elle fournit des informations sur les conditions qui conduisent à sa dégradation, ce qui nous servira à la conception des conditions convenables durant la fabrication et le stockage du médicament.

L'objectif de notre travail est d'étudier la stabilité d'un principe actif « répaglinide » dans des conditions de dégradation forcée suivie d'une étude de stabilité de son produit fini « Novonorm 0.5 mg, Cp non enrobés » dans des conditions accélérées.

Introduction

Le présent manuscrit se divise en deux parties :

La première partie concerne une revue de la littérature, elle est subdivisée en 2 chapitres, le premier sera consacré à la présentation du site LMTO et du produit. Le second abordera des généralités sur la stabilité des médicaments.

La seconde partie est réservée à la partie expérimentale. Nous présenterons dans un premier temps le matériel et les méthodes du travail, puis nous exposerons nos résultats suivis des discussions et en fin nous terminerons avec une conclusion.

Partie bibliographique

Chapitre 1 :
présentation du site LMTO
et du produit

1.1 Présentation du site LMTO (Local Manufacturing Tizi-ouzou)

Novonordisk est une entreprise pharmaceutique Danoise issue de la fusion de deux petites entreprises, Nordisk Insulin laboratorium et Novo Terapeutisk Laboratorium en 1989, elle figure en bonne place dans les domaines du traitement du diabète, de l'hémophilie, du traitement par l'hormone de croissance et de la thérapie de substitution hormonale. En effet Novonordisk regroupe aujourd'hui 16 sites de production présents dans neuf pays (Algérie, Brésil, Chine, Danemark, France, Japon, Russie, Royaume-Uni et États-Unis) ,10centres de Recherche et de Développement présents dans cinq pays (Chine, Danemark, Inde, Royaume-Uni et États-Unis) et 169 pays dans lesquels ses produits sont disponibles.

Local Manufacturing Tizi-ouzou (LMTO) est une filiale de Novonordisk Algérie implantée au niveau de la zone industrielle de Oued-Aïssi, Tizi-ouzou, elle est la première usine que réalise NOVONORDISK en Afrique. Cette dernière est conçue selon les exigences des bonnes pratiques de fabrication et des standards propres à Novonordisk. Elle produit des antidiabétiques oraux tels que « Novoformin comprimé » connu sous le nom de la Metformine à différents dosages ; 500 mg, 850 mg et 1000 mg. Actuellement, LMTO envisage la production d'un nouvel antidiabétique oral « Répaglinide », qui sera commercialisé sous le nom de Novonorm.

Inaugurée en 2006, avec un effectif initial de 30 employés et une capacité de production d'environ deux millions d'unités par année. Le nombre d'employés en activité est actuellement parvenu à 234 pour une capacité de production de 20 millions d'unités par année. L'usine dispose d'équipements technologiques de haute performance pour sa production et se compose de trois principaux départements à savoir : le département qualité (assurance qualité et contrôle qualité), le département technique (production et maintenance) et la logistique [1,2].

1.2 Présentation du répaglinide

Le répaglinide est une molécule antidiabétique de la classe des glinides, indiquée dans le traitement du diabète de type II ou diabète non insulino-dépendant. Il est particulièrement utile lorsque la glycémie ne peut pas être contrôlée par le régime alimentaire ou l'exercice physique seul ou lorsque la metformine ne peut pas être utilisée en raison d'effets indésirables et ne parvient pas à contrôler de manière adéquate les taux de glycémie. Il peut également présenter

un avantage chez les patients diabétiques souffrant d'insuffisance rénale car il est éliminé par excrétion biliaire [3].

1.2.1 Nomenclature et structure chimique

- Nom commercial : NOVONORM (site LMTO)
- Formule brute : $C_{27}H_{36}N_2O_4$
- Dénomination IUPAC : acide 2-éthoxy-4-[2-[[[(1S)-3-méthyl-1-[2-(pipéridin-1-yl)phényl] butyl]amino]-2-oxoéthyl]benzoïque.
- Structure chimique :

Le répaglinide est un dérivé de l'acide carbomoxyméthyl benzoïque, sa structure chimique est présentée dans la figure N°1 [4].

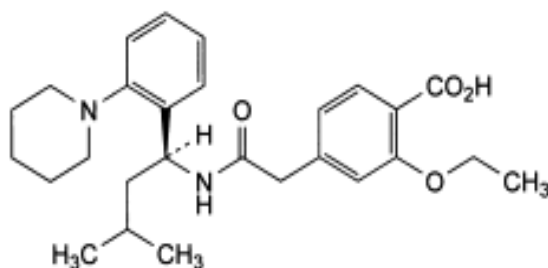


Figure N°1 : structure chimique du répaglinide

1.2.2 Stéréochimie

La stéréochimie des médicaments revêt un rôle très important tant du point de vue de leur activité biologique que de leur comportement pharmacocinétique. En effet, l'action pharmacologique d'un médicament n'est souvent portée que par un seul des énantiomères, le second, dans le meilleur des cas se révèle inactif.

Le répaglinide est une molécule chirale qui dispose d'un carbone asymétrique qui détermine sa stéréosélectivité. L'activité de l'énantiomère S est 100 fois plus supérieure à celle de l'énantiomère R, par conséquent, seul l'énantiomère S qui présente une activité thérapeutique, l'énantiomère R est une impureté [3].

1.2.3 Propriétés physico-chimiques du répaglinide

Le tableau N°1 résume les propriétés physicochimiques et organoleptiques du répaglinide [4,5].

Présentation de l'entreprise et du produit

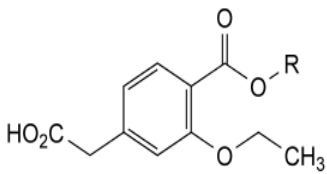
Tableau N°1 : propriétés physicochimiques et organoleptiques du répaglinide.

Répaglinide	Propriétés
Aspect	Poudre blanche ou sensiblement blanche
Masse molaire (g/mol)	452.6
Point de fusion (°C)	129-130
Teneur (%)	99 à 101 (substance desséchée)
Solubilité	Insoluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol et le chlorure de méthylène
Coefficient de partage : Log P	5.9 Le répaglinide présente un caractère lipophile (log P relativement élevée). Ceci est probablement dû à la présence d'une attraction électrostatique intramoléculaire entre le groupe amino aromatique chargé positivement et l'anion carboxylate chargé négativement.

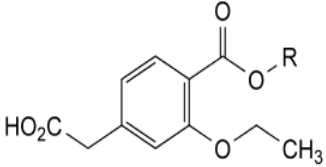
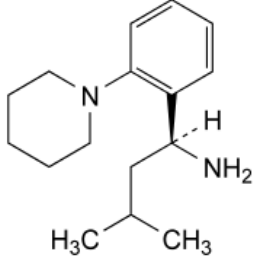
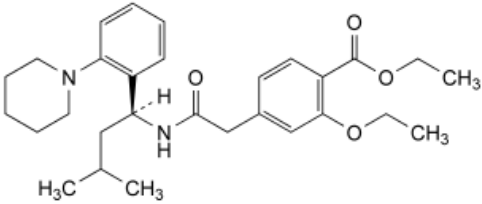
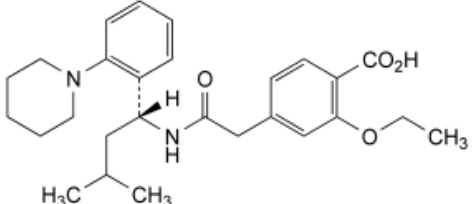
1.2.4 Impuretés du répaglinide

Les impuretés du répaglinide sont de nombre 5, le tableau N°2 montre les structures et nomenclatures des différentes substances apparentées du répaglinide selon la pharmacopée européenne (voir annexe II) [4].

Tableau N°2 : structures et nomenclatures des impuretés du répaglinide.

Impureté	Structure	Nomenclature
A		R = H : acide 4-(carboxyméthyl)-2-éthoxybenzoïque

Présentation de l'entreprise et du produit

B	 <p style="text-align: center;"> <chem>CCOC(=O)CC1=CC=C(C=C1)OC</chem> </p>	<p>R = C₂H₅: acide [3-éthoxy-4-(éthoxycarbonyl)phényl]acétique</p>
C	 <p style="text-align: center;"> <chem>CC(C)C[C@H](N)C1=CC=C(C=C1)N2CCCCC2</chem> </p>	<p>(1<i>S</i>)-3-méthyl-1-[2-(pipéridin-1-yl)phényl]butan-1-amine</p>
D	 <p style="text-align: center;"> <chem>CCOC(=O)CC1=CC=C(C=C1)OC(=O)CC[C@H](N)C1=CC=C(C=C1)N2CCCCC2</chem> </p>	<p>2-éthoxy-4-[2-[[[(1<i>S</i>)-3-méthyl-1-[2-(pipéridin-1-yl)phényl]butyl]amino]-2-oxoéthyl]benzoate d'éthyle</p>
E	 <p style="text-align: center;"> <chem>CCOC(=O)CC1=CC=C(C=C1)OC(=O)CC[C@H](N)C1=CC=C(C=C1)N2CCCCC2</chem> </p>	<p>acide 2-éthoxy-4-[2-[[[(1<i>R</i>)-3-méthyl-1-[2-(pipéridin-1-yl)phényl]butyl]amino]-2-oxoéthyl]benzoïque</p>

Chapitre 2 : étude de la stabilité des médicaments

Les études de stabilité d'un médicament ont une importance majeure lors du développement et de la mise sur le marché d'une nouvelle spécialité, leur objectif est de vérifier que la qualité des médicaments fabriqués répond aux spécifications exigées dans l'AMM et cela pendant toute leur durée de validité. Elles doivent être réalisées sur les principes actifs et sur le produit fini. Les études de stabilité pour le principe actif sont généralement réalisées avant celles du produit fini et donnent des indications sur la sensibilité de ce dernier [6].

2.1 Stabilité d'un médicament

Selon la conférence internationale d'Harmonisation (ICH), la stabilité d'un médicament est définie comme son aptitude à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans les limites spécifiées, pendant toute sa durée de validité.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), un médicament est considéré comme stable lorsque ses propriétés essentielles ne changent pas, ou changent dans des proportions tolérables jusqu'à sa date de péremption. Pour cela la stabilité des médicaments doit être surveillée selon un programme approprié et continu permettant la détection de tout problème relatif à la formulation du produit dans son conditionnement final [11].

L'USP définit 5 types de stabilité :

1. **La stabilité chimique** : chaque substance active conserve son intégrité chimique et son activité dans les limites spécifiées [8].
2. **La stabilité physique** : le produit pharmaceutique reste inchangé tout au long de sa durée de conservation sans altération de ses propriétés physiques. Son apparence, ses propriétés organoleptiques, sa dureté, sa fragilité et la taille de ses particules sont conservées [9].
3. **La stabilité microbiologique** : la stérilité ou la résistance à la croissance microbienne est maintenue conformément aux exigences spécifiées, les agents antimicrobiens éventuellement présents conservent leur efficacité dans les limites spécifiées [8].
4. **La stabilité thérapeutique** : les effets thérapeutiques restent inchangés.
5. **La stabilité toxicologique** : Aucune hausse notable de la toxicité n'est tolérée [8].

2.2 Objectifs de l'étude de stabilité

Les études de stabilité ont pour but de fournir des données probantes sur la façon dont la qualité d'un PA ou d'un produit fini varie en fonction du temps sous l'effet de divers facteurs

Etude de la stabilité des médicaments

environnementaux, tel que la température, l'humidité et la lumière. Les données obtenues permettent de définir les conditions de conservation et la durée de validité des produits ; deux paramètres importants dans la sécurité d'utilisation d'un médicament [7].

2.3 Conditions pour lesquelles une étude de stabilité est exigée

2.3.1 Cas du principe actif

- Principes actifs nouveaux.
- Modifications du procédé de synthèse.
- Modifications des spécifications du conditionnement primaire.
- Commercialisation sur une nouvelle zone climatique [7].

2.3.2 Cas du produit fini

- Médicament nouveau.
- Modifications qualitatives ou quantitatives de la composition.
- Modification du conditionnement primaire.
- Changement du site de fabrication.
- Confirmation de la durée de validité et des conditions de stockage annoncées.
- Prolongation de la durée de validité du produit [7].

2.4 Facteurs influençant la stabilité des médicaments

On dit d'un médicament qu'il est instable lorsque ce dernier subit un changement significatif tel que : [7]

- Perte en principe actif supérieur à 5%.
- Tout produit de dégradation au-dessus de sa limite.
- Changement des caractères organoleptiques.
- Non-conformité aux limites concernant le pH.
- Non-conformité aux limites concernant le test de dissolution.
- Altération de la qualité microbiologique.

La stabilité du médicament peut être influencée par plusieurs facteurs environnementaux tels que la chaleur, l'humidité, la lumière et l'oxygène (facteurs extrinsèques), ainsi que par d'autres facteurs liés au produit tels que la composition, la formulation, la fabrication et l'emballage (facteurs intrinsèques). Ces facteurs conduisent à des changements des propriétés physico-chimiques du produit médicamenteux, à sa dégradation et à l'altération de sa qualité et son efficacité par la suite [10].

2.4.1 Facteurs extrinsèques

2.4.1.1 Température

La température est l'un des facteurs les plus considérables dans la stabilité des médicaments, son augmentation donne lieu à des réactions d'oxydation, de réduction, et d'hydrolyse, source de toute altération du produit médicamenteux. Une augmentation de 10°C de la température de conservation, peut entraîner une augmentation de 2 à 5 fois la vitesse des réactions de dégradation. Dans d'autres cas, la baisse de la température pourrait affecter la stabilité physico-chimique du principe actif [12].

2.4.1.2 Lumière

La lumière est un facteur susceptible de provoquer une instabilité chimique des molécules photosensibles, elle peut fournir l'énergie d'activation nécessaire pour que des réactions de dégradation se déclenchent.

Les effets de la lumière peuvent être minimisés en apportant des modifications sur les conditionnements primaires et secondaires de façon à ce qu'ils retiennent ces rayons dans des conditions de conservations adéquates [13].

Un essai de photo-dégradation est décrit dans l'ICH Guidelines Q1F. Ce dernier sert à démontrer que l'exposition du produit médicamenteux à la lumière ne donne pas lieu à des changements significatifs [14].

2.4.1.3 Air

L'oxygène présent dans l'air ambiant est un élément qui peut nuire à la stabilité des préparations médicamenteuses et cela en induisant des réactions d'oxydations sur les groupements fonctionnels formant le composé (hydroxyles, acide carboxylique...) [12].

Afin d'éviter tout problème lié à l'oxydation, il est nécessaire d'adapter une formulation, une technique de fabrication et un conditionnement adéquats permettant de limiter le plus possible la diffusion de l'oxygène dans le médicament. (Ajout d'agents antioxydants, fabrication dans une atmosphère sous azote...) [9].

2.4.1.4 Humidité

L'humidité peut :

- Provoquer l'hydrolyse de certains principes actifs.
- Modifier la friabilité ou la dureté des comprimés.
- Provoquer la croissance de micro-organismes.

Les formes solides peuvent être protégées en appliquant un revêtement protecteur résistant à l'humidité sur les comprimés [14].

2.4.2 Facteurs Intrinsèques

2.4.2.1 pH

Le pH joue un rôle très important dans la solubilisation, et par conséquent la biodisponibilité du PA. Pour une meilleure stabilité possible, le pH doit être optimal (souvent identique à celui de la meilleure solubilité pour une molécule donnée). Si celui-ci est trop acide ou trop basique alors ces valeurs extrêmes induisent des instabilités, d'où une dégradation très importante du médicament [14].

2.4.2.2 Forme galénique

Les systèmes médicamenteux à entropie élevée telles que les émulsions et les suspensions sont moins stables. Les formes sèches (comprimés, gélules) sont le plus souvent stables par rapport aux formes liquides [10].

2.4.2.3 Interaction PA-Excipients

L'interaction PA-Excipients joue un rôle important dans la stabilité des préparations pharmaceutique, il peut s'agir d'une synergie dans ce cas l'interaction est considérée comme étant bénéfique, on observe par exemple une augmentation de la stabilité et de la solubilité, il peut s'agir également d'une incompatibilité qui peut causer l'altération de la qualité et l'activité thérapeutique du produit [15].

Deux catégories d'incompatibilité chimique sont distinguées :

- Interactions sans réactions chimiques directes avec les excipients mais qui peuvent être favorisées par ceux-ci. Il s'agit essentiellement de réactions d'hydrolyse et d'oxydation du PA.
- Interactions correspondant à des réactions chimiques covalentes entre PA-excipients, ces dernières font intervenir des groupements fonctionnels des excipients ou des impuretés pouvant interagir avec la molécule thérapeutique.

2.4.2.4 Polymorphisme

Le polymorphisme est l'aptitude d'un composé à l'état solide à se présenter sous différentes formes cristallines alors que sa composition chimique ne varie pas. Ces différentes formes issues d'une même molécule peuvent présenter des modifications des propriétés physico-chimiques et avoir des répercussions sur la stabilité [4].

2.4.2.5 Nature du récipient et du matériau de conditionnement

2.4.3 Autres facteurs

- La présence de certains microorganismes dans les préparations non stériles peut altérer la qualité du produit et par conséquent réduire ou annuler l'activité thérapeutique.
- Manipulation anarchique lors de la fabrication : Autoclavage, Broyage, Compression importante.
- Les chocs et les vibrations lors du transport [10].

2.5 Directives internationales

Les études de stabilité sont une exigence réglementaire réalisées selon les lignes directrices de l'ICH décrit dans la rubrique Qualité Q1, ce sont des lignes internationalement standardisées et reconnues, elles définissent les conditions de réalisation de l'étude [10].

L'ICH Q1 présente un ensemble de guides repartis en six chapitres, de Q1A à Q1F [11].

- ICH Q1A(R2) : « Stability testing of new drug substances and products ».
- ICH Q1B : « Photostability testing of new drug substances and products ».
- ICH Q1C : « Stability testing for new dosage forms ».
- ICH Q1D : « Bracketing and matrixing designs for stability testing of new drug substances and products ».
- ICH Q1E : « Evaluation of stability data ».
- ICH Q1F : «Stability data package for registration applications in climatic zones III and IV ».

2.6 Date de péremption

Pour chaque médicament mis sur le marché, Food and Drug Administration (FDA) et la Conférence Internationale d'Harmonisation (ICH) obligent qu'une date de péremption soit indiquée sur son conditionnement extérieur (plus souvent sur l'étiquette). Cette dernière indique qu'un médicament est utilisable jusque-là, sans qu'il soit forcément instable au-delà. Il est à noter qu'elle n'est appliquée qu'à un emballage intact, non ouvert et seulement si les conditions de conservation spécifiques établis par le fabricant ont été respectées. Elle est définie comme étant l'intervalle de temps où les caractéristiques du médicament resteront dans les limites des spécifications approuvées après sa fabrication [26].

La date de péremption d'un médicament est déterminée à partir des études de stabilité dans les conditions accélérées et en temps réel.

En règle générale, un médicament est déclaré périmé lorsque le titre initial en PA a diminué de 10 %. Ce chiffre, défini par un consensus international, peut être abaissé à 5 %, et parfois moins, lorsque les produits de dégradation sont très toxiques (cas des tétracyclines) ou lorsque l'index thérapeutique est étroit (anticancéreux, théophylline, digoxine...) [27].

2.6.1 Estimation de la date de péremption

L'estimation de la date de péremption consiste en une prédiction du moment où la stabilité d'un médicament ne serait plus dans les limites approuvées. C'est une étape indispensable dans le dossier de lot concernant la demande de la mise sur le marché d'un nouveau médicament [9].

La durée de vie est estimée à partir du guide d'ICH Q1E « évaluation des données de stabilité », cette ligne directrice décrit quand et comment on peut procéder à une extrapolation afin de proposer une période de contre-essais pour un PA ou une durée de conservation pour un produit fini au-delà de la plage des données obtenues, dans le cadre de l'étude de stabilité, dans des conditions d'entreposage de longue durée [11].

La détermination de la date de péremption doit être précise et justifiée, toute surestimation peut conduire à l'utilisation d'un produit dont la composition chimique est altérée, ce qui peut causer des effets secondaires indésirables ou graves pour le patient, et peut conduire par la suite à un retrait du médicament sur le marché. La période de la date de péremption doit être obtenue par une analyse expérimentale rigoureuse avec plusieurs lots de produit. Les procédures d'analyse et les conclusions tirées de l'analyse doivent être étroitement surveillées et bien encadrées [9].

2.6.2 Facteurs déterminant la date de péremption

La date de péremption dépend de la :

2.6.2.1 Dégradation

Les dates de péremption diffèrent d'un médicament à un autre en raison de la différence du taux et du processus de dégradation de ce dernier. Les processus de dégradation comprennent l'hydrolyse, l'oxydation et la dégradation par la lumière [28].

2.6.2.2 Formulation

La formulation d'un médicament peut avoir un effet sur la durée de vie à cause des excipients utilisés dans la fabrication. Certains médicaments peuvent être assez stables sous leurs formes pures, mais une fois combinés avec certains excipients, ils peuvent subir rapidement une dégradation [28].

2.6.2.3 Stockage et transport

La température du stockage ainsi que celle du transport peuvent facilement influencer sur la stabilité chimique d'un produit pharmaceutique, pour chaque augmentation de 10°C de température de conservation, la vitesse des réactions chimiques double. Par exemple, la suspension d'amoxicilline reconstituée est stable pendant 14 jours si elle est conservée à une température de 25 °C (température ambiante) et plus longtemps si elle est réfrigérée. Toutefois, si elle est conservée hors du réfrigérateur pendant les journées chaudes, sa stabilité peut être réduite à une semaine ou moins [28].

Le même cas pour l'insuline, les autorités sanitaires de certains pays chauds tel que l'Australie ont établi que la plupart des insulines peuvent être utilisées pendant 28 jours quand elles sont conservées à 25°C, à température plus élevée, leur validité diminue très rapidement : [29]

- 12 jours à 30°C
- 4 à 5 jours à 35°C
- 2 jours à 40°C
- 1 jour à 45°C
- Une demi-journée à 50°C

2.7 Types d'études de stabilités

2.7.1 Etude de stabilité dans les conditions réelles (à long terme)

Le but de l'étude de stabilité en temps réel est de confirmer la durée de vie préétablie du médicament et la possibilité de la prolonger [10]. Elle est réalisée sur une durée minimale de 12 mois et doit être poursuivie pendant toute la durée de vie du médicament dans des conditions climatiques identiques à la zone du pays où la spécialité pharmaceutique est commercialisée [6]. Les essais sont effectués à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et un taux d'humidité relative de $60 \pm 5\%$ [7].

L'organisation mondiale de la santé divise le monde en quatre zones climatiques. Le tableau N°3 résume les caractéristiques de chaque zone [16].

Etude de la stabilité des médicaments

Tableau N°3 : caractéristiques des différentes zones climatiques selon l’OMS.

Zones	Climats	Conditions d'étude en temps réel	
		Température	Humidité
Zone I	Tempéré	21°C	45%HR
Zone II	Méditerranéen	25°C	60%HR
Zone III	Chaud et sec	30°C	35%HR
Zone IV	Chaud et humide	30°C	65%HR

L’Algérie est un pays appartenant à une combinaison de la Zone III et IV.

2.7.2 Etude de stabilité dans les conditions intermédiaires

L’étude intermédiaire est réalisée à une température de 30 ± 2 °C et un taux d’humidité relative de 65 ± 5 % sur une période de 6 mois. Elle consiste à augmenter modérément la vitesse de dégradation chimique du médicament ou du principe actif stocké à 25°C.

L’étude de stabilité dans les conditions intermédiaires peut être poursuivie au-delà de 6 mois dans le cas où des changements significatifs sont observés lors de l’étude dans les conditions accélérées [7].

2.7.2 Etude de stabilité dans les conditions accélérées

L’étude de stabilité dans les conditions accélérées consiste à augmenter la vitesse de dégradation chimique ou physique du médicament en le soumettant à des conditions de stockage extrêmes [9], une température de 40 ± 2 °C et un taux d’humidité relative de 75 ± 5 %, les essais doivent être réalisés sur une période de 6 mois à au moins trois points définis dans le temps, y compris le premier et le dernier point de la période (ex : 0, 3 et 6 mois, pour une étude de 6 mois) [17].

La non-conformité des résultats obtenus, implique l’application d’une condition de température sur le conditionnement du médicament : « à conserver à une température ne dépassant pas 25 °C » [17].

Etude de la stabilité des médicaments

Le tableau N°4 résume les conditions de stockage ainsi que les fréquences d'analyses des études de stabilités [7].

Tableau N°4 : conditions de stockage, périodes et fréquences des analyses.

Etude	Conditions d'étude	Périodes minimales pour laquelle des données sont disponibles au moment de la présentation	Fréquences des analyses
Etude à long terme	25 ±2°C / 60 ±5 % HR où 30 ±2°C / 65 ±5 % HR	12 mois	Première année : chaque 3 mois : 0, 3, 6, 9, 12 mois. Deuxième année : chaque 6 mois : 12, 18, 24 mois. Au-delà : annuellement : 24, 36, 48, 60 mois.
Etude intermédiaire	30 ±2°C / 65 ±5 % HR	6 mois	Au minimum 4 points dans le temps : 0, 6, 9, 12 mois.
Etude accélérée	40 ±2°C / 75 ±5 % HR.	6 mois	Au minimum trois points dans le temps : 0, 3, 6 mois.

2.7.4 Etude de stabilité dans les conditions de stress

Egalement appelée « drastique » ou « étude de dégradation forcée ». Elle est réalisée uniquement sur les principes actifs non monographiés et sur les médicaments qui sont en phase de développement [10].

L'étude est réalisée sur un seul lot de la substance médicamenteuse, elle consiste à imposer au produit certaines conditions de stress plus rigoureuses que celles appliquées lors des études de stabilité à long terme ou accélérées à savoir :

- Une température extrême (entre 50 et 70°C, par intervalles de 10°C).

- Une humidité relative très forte (plus de 75%).
- De l'oxydation (H_2O_2 ...).
- De la photolyse (Par rayonnement UV et Visible).
- L'étude doit également permettre d'évaluer sur une large gamme de pH, la sensibilité de la substance à l'hydrolyse, qu'elle soit en solution ou en suspension dans un milieu acide (HCL) ou basique (NaOH) [7].

2.7.4.1 Intérêt de l'étude de la dégradation forcée

Les études de la dégradation forcée sont une partie importante du processus de développement d'un médicament, elles permettent le :

- **Développement d'une méthode d'analyse**

Afin d'évaluer la stabilité d'un composé médicamenteux, il est nécessaire de développer une méthode analytique appropriée qui permettra de détecter tous les produits de dégradation potentielle, pour cela, il faut avoir recours aux études de dégradation forcée [18].

- **Développement d'un conditionnement adéquat**

Les études de dégradations forcées fournissent des informations sur la sensibilité d'un composé à l'hydrolyse, l'oxydation, la chaleur et la lumière, à partir de ces informations, il est possible de faire le choix pour un conditionnement adéquat. Par exemple, pour un composé sensible à l'hydrolyse, son emballage doit être conçu de façon à ce qu'il protège la transmission de la vapeur d'eau de l'extérieur vers l'intérieur du conditionnement [18].

- **Détermination de la durée de vie et des conditions de stockage**

Les études de dégradation forcée jouent un rôle très important dans la détermination des conditions de stockage de la matière première et du produit fini. La connaissance des conditions qui provoquent la dégradation d'un produit est utile pour déterminer les conditions de conservation adéquates. Par exemple, un composé sensible à la photolyse doit être conservé à l'abri de la lumière ou son emballage doit être conçu d'une manière à ce que la lumière ne pénètre pas à l'intérieur de l'emballage.

Les informations obtenues à partir des études de dégradation forcée combinées à celles obtenues lors des études de stabilité dans les conditions accélérées peuvent être utilisées pour prévoir la durée de vie du produit [19].

- **Maîtrise de la formulation**

La connaissance des conditions qui conduisent à la dégradation du PA lors de la fabrication peut servir à la conception des conditions convenables permettant de limiter la dégradation.

Etude de la stabilité des médicaments

Par exemple, si un composé est sensible à l'oxydation, il est impératif d'utiliser un gaz inerte lors de la fabrication [18].

2.7.4.2 Conditions de stress

a. Dégradation hydrolytique

La dégradation hydrolytique est l'une des réactions chimiques de dégradation les plus fréquentes dans une large gamme de pH. L'hydrolyse est un processus chimique qui comprend la décomposition d'un composé chimique par réaction avec H₂O. La dégradation hydrolytique dans des conditions acides et basiques implique la catalyse des groupes fonctionnels ionisables présents dans la molécule.

- Le choix du type et des concentrations d'acide ou de base dépend de la stabilité de la substance médicamenteuse. HCl ou H₂SO₄ (0,1 à 1 M) pour l'hydrolyse acide et NaOH ou KOH (0,1 à 1 M) pour l'hydrolyse basique sont proposés comme réactifs appropriés pour l'hydrolyse.
- Si le composé à tester est peu soluble dans l'eau, des co-solvants peuvent être utilisés, le tableau N°5 montre quelques solvants qui ont été recommandés dans ces études.
- L'essai de stress est normalement commencé à température ambiante et s'il n'y a pas de dégradation, on applique une température élevée (50 - 70 °C).
- L'essai sous contrainte ne doit pas dépasser plus de sept jours. L'échantillon dégradé est ensuite neutralisé à l'aide d'un acide, d'une base ou d'un tampon approprié, afin d'arrêter la décomposition [18].

Tableau N°5 : co-solvants organiques utilisés dans les études de stress [30].

pH acide	pH neutre	pH basique
Acétonitrile	Acétonitrile	Acétonitrile
DMSO	NMP	DMSO
Acide acétique		Glyme
Acide propionique		Diglyme
		<i>p</i> -Dioxane

b. Dégradation thermolytique

La dégradation thermolytique est une dégradation qui implique des réactions guidées par la chaleur.

Etude de la stabilité des médicaments

- Elle doit être effectuée dans des conditions plus rigoureuses que les conditions de l'étude accélérée recommandée par l'ICH Q1A.
- Elle est généralement réalisée sur des échantillons solides. Les échantillons du PA et du produit fini à l'état solide doivent être exposés à une chaleur sèche et humide, tandis que les produits pharmaceutiques liquides doivent être exposés à une chaleur sèche.
- Les études peuvent être menées à des températures plus élevées pendant une période plus courte [10].

L'effet de la température sur la dégradation thermique d'une substance est étudié au moyen de l'équation d'Arrhenius :

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Avec :

K : coefficient de vitesse, anciennement appelé "constante de vitesse".

A : facteur pré-exponentiel, appelé aussi facteur de fréquence.

E_a: énergie d'activation d'Arrhenius.

T : température absolue(en Kelvin).

R : constante des gaz parfaits (R = 8,314 472 Pa.m³.K⁻¹.mol⁻¹)

La loi d'Arrhenius montre que les réactions ayant les énergies d'activation les plus faibles sont les plus rapides et vice versa.

- L'étude de la dégradation thermique est réalisée à 40-80 °C, sans dépasser les 80°C car, des températures trop élevées risquent d'entraîner des processus de dégradation secondaires non représentatifs [18].

c. Dégradation oxydante

L'agent oxydant le plus largement utilisé dans les études de stress est H₂O₂, mais d'autres agents peuvent également être utilisés tels que les ions métalliques et l'oxygène, le choix de l'agent oxydant, de sa concentration et des conditions dépend de la substance médicamenteuse.

La vitesse de la réaction d'oxydation par le peroxyde en solution peut être réduite à température élevée en raison de la diminution de la teneur en O₂ dissout. Ainsi, il convient de noter que la température ambiante est suffisante pour réaliser le test d'oxydation par H₂O₂. [18]

d. Dégradation photolytique

Les études de photostabilité sont réalisées pour générer des dégradants primaires du PA par exposition à des conditions ultraviolettes ou fluorescentes. Les échantillons destinés à l'étude doivent être exposés à un minimum de 200 W h/m² de lumière. La longueur d'onde de la lumière la plus communément acceptée est comprise entre 300 et 800 nm pour provoquer la dégradation photolytique. Le taux de dégradation dépend directement de la quantité du rayonnement incident et de la quantité du rayonnement absorbé par le composé [19].

Selon ICH Q1B, deux options pour les sources de lumière sont utilisées dans les essais de photostabilité :

- **Option 1**

Il s'agit de toutes les sources lumineuses donnant un rendement comparable à celui de l'étalon d'émission (D65/ID65) comme par exemple, une lampe fluorescente donnant une lumière du jour artificielle combinant la lumière visible et l'ultraviolet (UV), une lampe au xénon ou une lampe aux haloïdes (halogénures métalliques).

Le D65 est l'étalon international de la lumière du jour extérieure défini dans la norme ISO 10977. L'ID65 est l'équivalent de la lumière du jour indirecte intérieure.

Si la source lumineuse émet une partie importante de rayonnement sous les 320 nanomètres (nm), on peut éliminer ce rayonnement au moyen de filtres appropriés.

- **Option 2**

L'échantillon doit être exposé à la fois à une lumière fluorescente blanche froide et dans le proche ultraviolet.

Une lampe fluorescente à lumière blanche froide donnant un rendement comparable à celui indiqué dans la norme ISO 10977, et une lampe dans le proche ultraviolet avec distribution spectrale entre 320 nm et 400 nm et une émission d'énergie maximum comprise entre 350 nm et 370 nm.

Les ICH décrivent deux types de tests pour la détermination de la photostabilité d'un médicament à savoir, le test de la dégradation forcée et le test de confirmation de la photostabilité.

Les épreuves de confirmation servent à déterminer les caractéristiques de photostabilité du produit dans des conditions normalisées. Elles permettent de savoir s'il y a lieu de prendre des précautions particulières dans la fabrication ou le choix de la formule et s'il faut utiliser un

emballage photorésistant et /ou donner des indications spéciales sur l'étiquette pour réduire le risque d'exposition à la lumière [11].

2.8. Conditions de réalisation d'une étude de stabilité (Cas d'un produit fini)

2.8.1 Conditions sur la sélection des lots

- Les essais de stabilité doivent se faire sur au moins trois lots du produit fini.
- Les lots de produits finis doivent être produits au minimum, à au moins un dixième de la taille de lots prévus pour la production industrielle.
- Les lots primaires doivent être de formulation et d'emballage identiques à ceux proposés pour la commercialisation, de même pour le procédé de fabrication, il doit être le même que celui prévu à l'échelle industrielle.
- Le procédé doit fournir un produit qui est de même qualité et qui répond aux mêmes spécifications que les lots de commercialisation.

2.8.2 Conditions portant sur le conditionnement

Les essais de stabilité doivent être effectués sur la forme posologique ayant un conditionnement identique ou similaire au conditionnement commercial prévu.

2.8.3 Conditions portant sur la durée et les conditions de réalisation de l'étude

La durée et les conditions de réalisation de l'étude de stabilité sont résumées dans le tableau N°4 (voir titre 7 : Type d'études de stabilités)

2.8.4 Conditions portant sur les méthodes analytiques

Toutes les méthodes analytiques utilisées lors de l'étude (identification, dosage du principe actif et des impuretés, Vérification des teneurs...) doivent être validées conformément aux guides et aux textes réglementaires [7].

2.9 Gestion des études de stabilité au niveau du site LMTO

Les études de stabilité d'un médicament fonctionnent selon un mode de gestion précis et font appel à différents secteurs de l'industrie pharmaceutique afin de mener celles-ci. La figure N°2 montre un organigramme de la gestion de l'étude de stabilité avec les différents chapitres couvrant le sujet au niveau du site LMTO.

Etude de la stabilité des médicaments

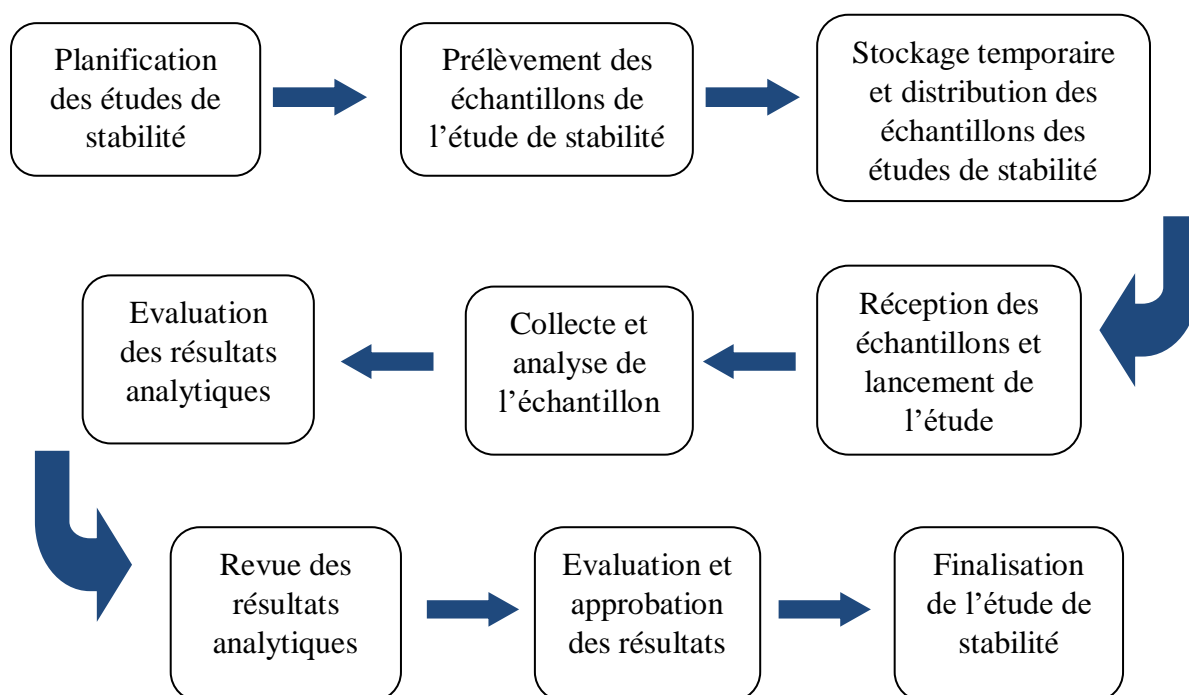


Figure N°2 : organigramme de la gestion de l'étude de stabilité au niveau du site LMTO.

2.9.1 Planification de l'étude de stabilité

Pour n'importe quel type d'étude de stabilité, un plan de prélèvement des échantillons pour stabilité est élaboré en tenant compte du point de lancement T0 comme étant la date de mise en enceinte climatique et en additionnant mois par mois à ce point de lancement afin de fixer la date du prochain contrôle. Le plan de prélèvement doit faire l'objet d'une vérification par une deuxième personne avant son application et sera documenté au niveau du protocole dédié à l'étude de stabilité [20].

2.9.2 Prélèvement des échantillons d'étude de stabilité

- Le prélèvement doit être exécuté de façon à ce que les échantillons soient représentatifs du lot à étudier.
- Le prélèvement doit se faire de façon aléatoire sur l'ensemble du lot conditionné.
- La quantité des échantillons doit être suffisante pour la réalisation de toutes les analyses programmées [20].

2.9.3 Réception des échantillons et lancement de l'étude de stabilité

- Avant le lancement de l'étude de stabilité, il est indispensable de vérifier que les échantillons reçus remplissent les conditions décrites dans le protocole.

Etude de la stabilité des médicaments

- Par ailleurs, si l'approbation du résultat d'analyse en routine est utilisée comme étant une date de lancement de l'étude, la date de chaque temps d'analyse ne doit pas différer de la date d'approbation du premier résultat d'analyse T0 de plus de 30 jours calendaires.
- Les échantillons doivent être étiquetés individuellement avant leur mise dans les enceintes climatiques en y mentionnant les informations citées ci-dessous et en procédant en deux parties : La première partie est réalisée au niveau de la production durant le prélèvement et concerne les points suivants : Désignation de l'échantillon, numéro de lot, date de Fabrication et Péréemption, visa et date de prélèvement. Quand a la deuxième partie, elle sera effectuée au département qualité, elle couvre les points suivants: Temps et date d'analyse, type d'étude de stabilité, étiquetage fait : Date et Visa, Etiquette vérifiée : date et Visa (Initiales de l'opérateur) [20].

2.9.4 Collecte et analyse des échantillons

- Le département qualité en charge des études de stabilité procédera au moment planifié au prélèvement des échantillons de l'enceinte climatique et à leur distribution pour effectuer leur analyse.
- Pour les études de stabilité à long terme, les échantillons peuvent être prélevés à ± 5 jours calendaires de la date initialement planifiée.
- Pour les études accélérées et intermédiaires, l'échantillon peut être prélevé avec un écart de ± 2 jours calendaires de la date initialement planifiée.
- Après finalisation de l'ensemble des tests sur les échantillons prélevés pour l'étude, les résultats doivent être revue au niveau du laboratoire avant leur envoi à l'assurance qualité aux fins de revue et d'évaluation finale avant approbation définitive [20].

2.9.5 Déviations des limites de spécifications de stabilité

Si les limites de spécification de stabilité sont dépassées, une instruction « Investigation of out of spécification » (OOS) doit être suivie, ainsi on peut avoir la possibilité de remplacer le résultat d'une OOS invalidé par un autre résultat suite à un re-test /remplacement à condition que le re-test ou remplacement soit fait selon les exigences en terme de temps d'analyse [20].

2.9.6 Evaluation des résultats

Après la finalisation de l'ensemble des tests de stabilité, les résultats seront obligatoirement revus au niveau du laboratoire CQ en premier lieu, ensuite envoyés à l'AQ pour une seconde revue et évaluation finale avant leur approbation finale [20].

2.9.7 Finalisation de l'étude de stabilité

A l'accomplissement de l'étude, les échantillons restants de l'étude de stabilité doivent être traités comme déchets pharmaceutiques, tout en veillant à ce que le nombre restant correspond à celui réellement non utilisé [20].

2.10 Tests à réaliser pour une étude de stabilité (Cas d'une forme orale solide)

2.10.1 Aspect

Il s'agit d'un examen visuel qui consiste en une description qualitative sur l'état, la taille, la forme, et la couleur de la forme pharmaceutique. Si l'un de ces paramètres présente un changement au court du temps et lors du stockage, des mesures appropriées doivent être prises [21].

2.10.2 Test d'identification

L'objectif du test d'identification est de confirmer l'identité de la substance active et cela en se référant obligatoirement à des spécifications. Parmi les méthodes analytiques utilisées on trouve : [21,22]

- Analyses spectrométriques : spectrométrie d'absorption infrarouge (IR), Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).
- Analyses chromatographiques : chromatographie liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en phase gazeuse (CPG), chromatographie sur couche mince (CCM).
- Constantes physiques : point de fusion, Pouvoir rotatoire ...etc.

2.10.3 Dosage

L'objectif du dosage est de déterminer la teneur en principe actif dans une nouvelle substance médicamenteuse ou un nouveau produit médicamenteux. Pour se faire, une méthode spécifique indicatrice de la stabilité doit être établie. Dans de nombreux cas, on peut appliquer la même procédure pour le dosage du nouveau produit médicamenteux et la quantification des impuretés. Il est très fréquemment réalisé à l'aide d'une HPLC [21].

2.10.4 Perte a la dessiccation

Selon la pharmacopée européenne, la perte à la dessiccation est la perte de masse exprimée en pourcentage m/m [4].

2.10.5 Test de dissolution

L'essai de dissolution est un test pharmaco-technique destiné à déterminer la plus ou moins grande aptitude d'une forme galénique à laisser passer en solution, dans un milieu déterminé, le ou les principes actifs qu'elle contient. Le passage en solution est apprécié par le dosage du

principe actif dans des échantillons prélevés du milieu de dissolution à intervalles de temps différents [23].

2.10.6 Test de dureté ou de résistance à la rupture

Le test de dureté consiste à exercer une pression sur le comprimé jusqu'à son point de rupture, cela permet de s'assurer que le comprimé présente une résistance mécanique suffisante pour ne pas se briser lors de diverses situations telles que le stockage et l'emballage, la livraison et la manipulation par l'utilisateur.

La détermination de la dureté d'un comprimé se fait à l'aide d'un appareil appelé « duromètre » [24,25].

2.10.7 Test d'uniformité de masse

Cet essai permet de s'assurer qu'au cours de la fabrication, la répartition du mélange initial de poudre ou de granulés, en unités de prises, a été suffisamment précise et uniforme pour garantir une même masse et donc une même teneur en principe actif pour l'ensemble des comprimés d'un même lot. Cet essai n'est exigé que pour les comprimés non enrobés, sauf exception autorisée, pour les comprimés pelliculés [24].

2.10.8 Test d'uniformité de teneur

L'essai d'uniformité de teneur des comprimés permet de vérifier que la quantité de substance active sur l'ensemble des comprimés d'un même lot de spécialité est uniforme.

Cet essai consiste à doser la substance active d'un nombre spécifié de comprimé du lot et à vérifier que chaque teneur individuelle en substance active se trouve dans les limites établies par rapport à la teneur moyenne de l'échantillon [25].

2.10.9 Test de limites microbiennes

Cet essai permet de s'assurer que les limites de contaminations microbiennes par lot contrôlé ne sont pas dépassées. Pour cela les pharmacopées préconisent :

- Dénombrement des germes aérobies viables totaux (*bactéries, moisissures et levures*) par la méthode de filtration sur membrane ou par dénombrement sur plaque.
- Recherche spécifiée d'*Escherichia coli* par une méthode appropriée qui utilise une série bien ordonnée de milieux de culture sélectifs [25].

Partie expérimentale

Chapitre 3 :

matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Cette étude a été effectuée essentiellement au sein des laboratoires du site LMTO, à savoir : le laboratoire de contrôle de la qualité physico-chimique et le laboratoire de microbiologie, mais également au niveau des laboratoires pédagogiques de chimie pharmaceutique et chimie des surfaces et catalyse de la faculté des sciences de l'UMMTO. Son but est double, le premier consiste à collecter des informations sur la sensibilité du répaglinide à l'hydrolyse, l'oxydation, la chaleur et la lumière, à partir d'une étude de dégradation forcée du PA. Le second est de s'assurer, après une étude préliminaire de stabilité dans des conditions accélérée, que le Novonorm 0.5mg, comprimés destinés à une large consommation, demeurera stable tout au long de sa durée de validité, avant sa libération sur le marché.

Les échantillons analysés en vue d'une étude de stabilité accélérée ont été placés dans une enceinte climatique réglée à une température de $40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et à une humidité relative de $75\% \pm 5\%$, cette dernière est reliée à un thermo-hygro-mètre permettant le maintien de la température et de l'humidité. Les différents tests à réaliser lors de cette étude à T0 (avant de soumettre les échantillons à l'enceinte climatique), T3 (après 3 mois) et T6 (après 6 mois) sont résumés dans le tableau N°6.

Quand à l'étude de la dégradation forcée, elle a été réalisée selon les normes ICH Q1A-R2 et Q1B, à différentes conditions de stress à savoir la dégradation photolytique (par la lumière), thermolytique (par la chaleur), hydrolytique (dans un milieu acide et basique) et oxydative (par le peroxyde d'hydrogène).

Tableau N°6 : programme d'étude de stabilité accélérée et les différents tests réalisés.

Produit	Novonorm		
Principe actif	Répaglinide		
Forme galénique	Comprimés non enrobés		
Dosage	0.5mg		
Date de lancement de l'étude	21 février 2021		
Date de chaque prélèvement	T0	T3	T6
	21 fév. 2021	21 mai 2021	21 Août 2021
Tests	Limites		
Aspect	Comprimés ronds, biconvexes, de couleur blanchâtres, avec la gravure du logo NOVO NORDISK sur une face.		
Test de dureté	20 - 80 N		
Test de perte a la dessiccation	$\leq 6.0 \%$		

Matériel et méthodes

Identification du P.A par HPLC	Le spectre et le Tr de l'échantillon doivent être comparables avec ceux du STD2	
Dosage du P.A par HPLC	95.0 % ≤ % répaglinide ≤ 105.0 %	
Dosage des impuretés par HPLC	Impuretés individuelles <0.2 % Impuretés totales ≤0.5 %	
Test de dissolution	Concentration moyenne du répaglinide en pourcentage ≥ 70% à 30 min	
Test de pureté microbienne	Dénombrement des Germes Aérobie totaux	≤ 1000 cfu/g
	Dénombrement des Levures et moisissures totales	≤ 100 cfu/g

3.1 Matériel

3.1.1 Matières premières et standards

- Novonorm 0.5 mg, produit fini
- Répaglinide, USP RS (Substance de référence)
- MPPBA : Repaglinide Related Compound A RS (Impureté de synthèse du répaglinide)

3.1.2 Réactifs

- Méthanol (CH₃OH) grade HPLC
- Eau pour chromatographie (eau purifiée)
- Acétonitrile (CH₃CN) grade HPLC
- Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄)
- Dihydrogénophosphate d'ammonium (NH₄H₂PO₄)
- Acide phosphorique (H₃PO₄ à 85 %)
- Acide citrique monohydraté (C₆H₈O₇.H₂O)
- Phosphate de sodium dibasique (Na₂HPO₄.H₂O)
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)
- Acide chlorhydrique (HCL)
- Hydroxyde de sodium (NaOH)

3.1.3 Verreries et autres

- Bêchers
- Fioles jaugées: 10 ml, 20 ml, 25 ml, 50 ml et 1000 ml

Matériel et méthodes

- Pipettes graduées : 1 ml, 2 ml, 5 ml et 10 ml
- Pipettes pour ajustement
- Pro-pipettes
- Micropipette : 1000 μ l
- Erlenmeyers : 1000 ml et 5000 ml
- Eprouvettes graduées : 10 ml et 1000 ml
- Spatules
- Boîtes de pétries
- Flacons
- Mortiers en verre
- Barreaux magnétiques
- Seringues
- Acrodisques LC, 045 μ m PVDF
- Vial pour HPLC
- Pissettes pour eau
- Gants et lunettes de sécurité.

3.1.4 Appareils et équipements

- Enceinte climatique
- Chromatographe HPLC à détecteur UV/ PDA et à détecteur fluorimétrique
- Dissolutest
- Dessiccateur halogène
- Duromètre
- PH-mètre
- Lampe UV
- Balance analytique
- Agitateur magnétique
- Plaque chauffante
- Etuve
- Centrifugeuse
- Bain-marie
- Bain à ultrason
- Bain thermostaté
- Montage à reflux

3.2 Méthodes

3.2.1 Etude de la dégradation forcée du répaglinide

Le présent travail a été effectué au sein des laboratoires pédagogiques de chimie pharmaceutique et de chimie des surfaces et catalyse de la faculté des sciences de l'UMMTO. L'étude a été réalisée sur du répaglinide RS-USP (standard du répaglinide).

Après chaque dégradation, les échantillons ont été analysés par HPLC au niveau du LCQ LMTO, les conditions chromatographiques ainsi que les séquences d'injections appliquées sont représentées dans les tableaux 7 et 8.

Pour chaque dégradation, deux échantillons ont été préparés pour une double détermination.

Tableau N°7 : conditions chromatographiques utilisées dans l'étude de dégradation forcée du répaglinide.

Equipement	
Système HPLC	Détecteur UV/PDA
Logiciel	Empower
Colonne	Longueur : 6.0 cm
	Diamètre interne : 4.0 mm
	Granulométrie : 5 µm
	Phase stationnaire : Gel de silice post greffée C18 octadécylsilylé
Conditions opératoires	
Longueur d'onde du dosage des impuretés	210 nm
Débit	1 mL/mn
Volume d'injection	20 µL
Température du four de la colonne	40°C
Temps d'analyse	10 minutes
Phase mobile (pompe)	Mélange de 70% du méthanol et 30% de la solution tampon 2.5

Tableau N°8 : séquences d'injections appliquées dans l'étude de dégradation forcée du répaglinide.

Séquence d'injections	Nombre d'injections
Diluant	02 fois au début de la séquence 01 fois à la fin de la séquence
Solution SST	03 fois, au début, au milieu et à la fin de la séquence
Solution STD 3	06 fois, répartie dans la séquence
Solution 0.05% DTD	01 fois
Solutions échantillons	01 fois

3.2.1.1 Préparation des échantillons

a. Dégradation acide

- Préparation de la solution de HCl 0.5N dans du méthanol et de l'eau (50; 50) :

24 mL d'eau purifiée, 2 mL d'acide chlorhydrique et 24 mL de méthanol ont été versés respectivement dans une fiole jaugée de 50 mL. La solution a été laissée au repos pendant 10 min.

- Une prise d'essai de 10 mg du répaglinide RS a été dissoute dans 10 mL de la solution de HCl préparée précédemment et maintenue à une température ambiante pendant 72 heures à l'abri de la lumière.

b. Dégradation basique

- Préparation de la solution de NaOH 1N dans du méthanol et de l'eau (50 ; 50) :

Une prise d'essai de 2 g de NaOH (Pastilles) a été dissoute dans un mélange de 25 mL d'eau purifiée et 25 mL de méthanol. Le mélange a été agité manuellement jusqu'à dissolution complète des pastilles de NaOH et laissé au repos pendant 10min.

- Une prise d'essai de 10 mg du répaglinide RS a été dissoute dans 10 mL de la solution préparée précédemment et maintenue à une température ambiante pendant 24 heures à l'abri de la lumière.

c. Dégradation neutre

Une prise d'essai de 10 mg du répaglinide RS a été mise en suspension dans 10 mL d'eau purifiée. La suspension a été portée à reflux pendant 15 heures.



Figure N°3 : échantillon du répaglinide en suspension dans l'eau porté à reflux.

d. Dégradation oxydative

Préparation de la solution oxydante :

Un volume de 10 mL de H₂O₂ à 30% a été versé dans une fiole jaugée de 20 mL, 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau purifiée ont été ensuite rajoutés.

- Une prise d'essai de 10 mg du répaglinide RS a été dissoute dans 10 mL de la solution oxydante préparée précédemment et maintenue à une température de 80°C au bain marie pendant 4 heures.



Figure N°4 : solution oxydante contenant du répaglinide au bain-marie.

e. Dégradation thermique

Une prise d'essai de 10 mg du répaglinide RS a été étalée sur une boîte de pétri et placés dans une étuve à une température de 60°C pendant 8 jours.

f. Dégradation photolytique

Une prise d'essai de 10 mg du répaglinide RS a été étalée sur une boîte de pétri et placés dans une chambre UV à une longueur d'onde de 365 nm pendant 10 jours.

3.2.2 Dilution

Tous les échantillons obtenus après la dégradation hydrolytique (acide/base/neutre), oxydative, thermique et photolytique ont été dilués à 80 µg/mL avec le diluant et soumis à l'analyse par HPLC.

3.2.2 Etude de la stabilité de Novonorm 0.5 mg, dans les conditions accélérées

Pour chaque essai réalisé sur le lot des Cp de Novonorm 0.5 mg, nous avons prélevé un certain nombre de Cp qui figure dans le tableau N°9. Tous les essais ont été réalisés selon la pharmacopée américaine.

Tableau N°9 : nombre de Cp prélevés pour chaque essai.

Essais	Nombre de comprimés prélevés (× 3)
Aspect	20
Test de dureté	10
Test de perte à la dessiccation	22
Dosage du principe actif et des impuretés	8
Test de dissolution	6
Total	66

3.2.2.1 Aspect

L'aspect de Novonorm 0.5 mg, à été vérifié soigneusement par un simple examen visuel (à l'œil nu) sur 20 Cp du produit fini. Le test consiste à examiner :

- la forme et la couleur de chaque Cp.
- la présence ou l'absence de barre de cassure ou de gravure.
- la présence ou l'absence de cassure provoquée par un choc sur chaque Cp.
- la texture de la surface de chaque Cp (rugueuse ou lisse).

- Critères d'acceptation

Les 20 Cp d'un même lot de la spécialité contrôlée doivent présenter une uniformité d'aspect (couleur, forme et texture) et ne doivent pas révéler d'anomalies (cassures ou couleur anormale).

En se référant aux spécifications internes fixées par le laboratoire LMTO, les Cp de Novonorm 0.5 mg doivent être ronds, biconvexes, avec la gravure du logo NovoNordisk sur une face.

3.2.2.2 Test de dureté (la résistance à la rupture)

Dix comprimés de Novonorm 0.5 mg ont été prélevés, chaque Cp a été placé entre les 2 mâchoires du duromètre, la valeur du diamètre de chaque Cp a été introduite dans la mémoire de l'appareil et la mesure a été lancée. Cette mesure à été effectuée sur chacun des 10 Cp

Matériel et méthodes

prélevés tout en prenant soin d'éliminer tout débris de Cp entre les mâchoires de l'appareil avant chaque nouvelle détermination.

- Critères d'acceptation

En se référant aux spécifications internes fixées par le laboratoire LMTO, la dureté des Cp de Novonorm 0.5 mg doit être comprise entre 20 N et 80 N.

3.2.2.3 Test de perte à la dessiccation (LOD)

Vingt-trois comprimés de Novonorm 0.5 mg ont été broyés, une prise d'essai de 2 g du broyat a été placée dans le dessiccateur. La dessiccation de la substance a été effectuée à une température de $105 \pm 2^\circ\text{C}$, jusqu'à masse constante.

- Critères d'acceptation

La perte à la dessiccation a été calculée grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ Perte à la dessiccation} = \frac{PEI - PEF}{PEI} \times 100$$

Avec :

PEI : poids de poudre initiale (avant la dessiccation).

PEF : poids de poudre finale (après la dessiccation).

En se référant aux spécifications internes fixées par le laboratoire LMTO, le test est conforme si le pourcentage de la teneur en eau est $\leq 6.0 \%$.

3.2.2.4 Identification du répaglinide par HPLC

Suivant la méthode décrite dans l'USP-44 [44], l'identification du répaglinide a été réalisée par HPLC avec un détecteur UV/PDA, elle s'est faite par comparaison du temps de rétention du pic majeur de l'échantillon avec celui du standard.

3.2.2.5 Dosage du principe actif et des impuretés

a. Préparation des solutions Tampons, phase mobile et diluant :

- **Préparation de la solution Tampon pH 2.5**

- Une prise d'essai de 2 g d'ammonium dihydrogène phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) a été dissoute dans 70 mL d'eau pour chromatographie et placée sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète.
- Le mélange a été versé dans une éprouvette de 1000 mL et complété par de l'eau pour chromatographie jusqu'au trait de jauge puis transféré dans un Erlenmeyer.
- Le pH de la solution a été ajusté à un pH 2.5 par l'ajout de quelques gouttes d'acide phosphorique (H_3PO_4 85%) à une température de 25°C.

- **Préparation de la solution Tampon pH 4.0**

- Une prise d'essai de 2 g d'ammonium dihydrogène phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) a été dissoute dans 70 mL d'eau pour chromatographie et placée sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète.
- Le mélange a été versé dans une éprouvette de 1000 mL et complété par de l'eau pour chromatographie jusqu'au trait de jauge puis transféré dans un Erlenmeyer.
- Le pH de la solution a été ajusté à un pH 4.0 par l'ajout de quelques gouttes d'acide phosphorique (H_3PO_4 85%) à une température de 25°C.

- **Préparation de la phase mobile**

Un volume de 700 mL de méthanol a été mélangé dans un Erlenmeyer de 1000 mL avec 300 mL de la solution tampon 2,5. Le mélange a été mis sous agitation pendant 30 min.

- **Préparation du diluant**

Un volume de 700 mL de méthanol a été mélangé dans un Erlenmeyer de 1000 mL avec 300 mL de la solution tampon 4,0. Le mélange a été mis sous agitation pendant 30 min.

a. Préparation des standards

- **Préparation de la solution standard 1 (solution mère 800 µg/mL) : STD1**

Dans une fiole jaugée de 50 mL, 40 mg du standard de répaglinide ont été dissouts dans 20 mL de méthanol. Ce mélange a été complété au trait de jauge avec le même solvant.

Matériel et méthodes

- **Préparation de la solution standard 1 de contrôle : STD1 contrôle**

La STD1 de contrôle a été préparée de façon identique à la STD1.

- **Préparation de la solution standard 2 (80 µg/mL) : STD2**

Un volume de 5 mL de la solution STD1 a été dilué dans 50 mL du diluant.

- **Préparation de la solution standard 2 de contrôle (80 µg/ml) : STD2 contrôle**

Un volume de 5 mL de la solution STD1 de contrôle a été dilué dans 50 mL du diluant.

- **Préparation de la solution standard 3 (0.2 µg/mL) : STD3** (*Pour le dosage des impuretés*)

Un volume de 2.5 mL de la solution STD 2 a été dilué dans 1000 mL du diluant (0.25%).

- **Préparation de la solution 0.05% surface standard (0.04 µg/mL) :** (*Limite d'exclusion : pour le dosage des impuretés*)

Un volume de 04 mL de la solution STD3 a été dilué dans 20 mL du diluant.

- **Préparation de la solution standard MPPBA (SST mère 80 µg/mL)**

Dans une fiole jaugée de 100 mL, 08 mg du standard MPPBA ont été dissouts dans 50 mL de méthanol. Le mélange a été complété au trait de jauge avec le même solvant.

- **Préparation de la solution System suitability (SST)**

Un volume de 01 mL de la solution standard MPPBA avec 05 mL de la solution standard 1 ont été dilués dans 50 mL du diluant.

b. Préparation de l'échantillon

Deux solutions échantillon ont été préparées pour une double détermination.

- Huit comprimés de Novonorm 0.5 mg ont été pesés dans une fiole jaugée de 50 mL. A ces Cp a été ajoutés 30 mL du diluant, le tout a été placé sous agitation magnétique pendant 20 min.
- A la fin de l'agitation, le mélange a été complété par du diluant jusqu'au trait de jauge puis, de nouveau remis sous agitation pendant 10 min.
- Ensuite, il a été prélevé une partie de la solution pour le remplissage des tubes destinés à être soumis à une centrifugation de 15 min à 3000 rpm.

Matériel et méthodes

- Un vial pour HPLC a été rempli avec le surnageant.

Les conditions chromatographiques utilisées dans l'essai de dosage du répaglinide et des impuretés sont résumées dans le tableau N°10.

Tableau N°10 : les conditions chromatographiques dans l'essai de dosage du répaglinide et des impuretés.

Equipement	
Système HPLC	Détecteur UV/PDA
Logiciel	Empower
Colonne	Longueur : 6.0 cm
	Diamètre interne : 4.0 mm
	Granulométrie : 5 µm
	Phase stationnaire : Gel de silice post greffée C18 octadécylsilylé
Conditions opératoires	
Longueur d'onde du dosage du PA	245 nm
Longueur d'onde du dosage des impuretés	210 nm
Débit	1 mL/mn
Volume d'injection	20 µL
Température du four de la colonne	40°C
Temps d'analyse	10 minutes
Phase mobile (pompe)	Mélange de 70% du méthanol et 30% de la solution tampon 2.5

Les séquences d'analyses dans l'essai de dosage du répaglinide et des impuretés se résument dans les tableaux suivants.

Tableau N°11 : séquence d'injections dans l'essai de dosage du répaglinide.

Séquence d'injections	Nombre d'injections
Diluant	02 fois au début de la séquence 01 fois à la fin de la séquence
Solution SST	03 fois, au début, au milieu et à la fin de la séquence
Solution STD 2	05 fois, répartie dans la séquence
Solution STD 2 de contrôle	03 fois, au début, au milieu et à la fin de la séquence
Solutions échantillons	01 fois

Tableau N°12: séquence d'injections dans l'essai de dosage des impuretés du répaglinide.

Séquence d'injections	Nombre d'injections
Diluant	02 fois au début de la séquence

Matériel et méthodes

	01 fois à la fin de la séquence
Solution SST	03 fois, au début, au milieu et à la fin de la séquence
Solution STD 3	06 fois, répartie dans la séquence
Solution 0.05% DTD	01 fois
Solutions échantillons	01 fois

- **Paramètres de conformité du système chromatographique :**

- **Calcul de la résolution (Rs) :**

$$R_S = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h1} + w_{h2})}$$

Avec :

t_R : temps de rétention des pics.

w_h : largeur des pics à mi-hauteur.

- **Calcul du facteur de symétrie (As) :**

$$A_S = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

Avec :

$w_{0.05}$: largeur du pic au vingtième de sa hauteur.

d : distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.

- **Calcul du standard de déviation relatif (RSD) en % :**

$$RSD (\%) = \frac{\sigma}{A} \times 100$$

Avec :

σ : écart type des aires des pics des 6 injections du STD.

A : moyenne des aires des pics.

- **Calcul du facteur de similarité:**

$$\text{Facteur de similarité} = \left(\frac{S_{STD2}}{S_{cntrl2}} \right) \times \left(\frac{C_{cntrl2}}{C_{STD2}} \right) \times 100$$

Avec :

S_{STD2} : surface du pic de la solution STD 2.

S_{cntrl2} : surface du pic de la solution STD 2 de contrôle.

Matériel et méthodes

C_{STD2} : concentration du standard de répaglinide en solution STD2 (mg/ml).

C_{ctrl2} : concentration du standard de répaglinide en solution STD2 de contrôle (mg/ml).

- Calcul de la sensibilité du détecteur (Rapport signal /bruit) :

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

Avec :

H : hauteur du pic repaglinide.

h : amplitude du bruit dans un chromatogramme obtenu après injection du blanc.

• Calcul de la teneur en principe actif (En pourcentage) :

La teneur en principe actif est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ Répaglinide} = \left(\frac{S_{ech}}{S_{STD2}} \right) \times \left(\frac{C_{STD2}}{C_{ech}} \right) \times 100$$

Avec :

S_{ech} = surface maximale de la solution échantillon.

S_{STD2} = surface moyenne des 5 injections de la solution STD 2.

C_{STD2} = concentration du standard de répaglinide en solution STD2.

C_{ech} = concentration nominale du répaglinide dans la solution échantillon.

$$C_{STD2} = \frac{P_e \times P \times f_n}{V \times 100} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)$$

Avec :

P_e : pesée du standard de répaglinide STD1 (mg).

P : pureté du standard de référence du répaglinide.

f_n : facteur de dilution.

V : volume de la solution utilisée.

$$C_{ech} = \frac{P_{ech} \times T}{PM \times 100} (mg/ml)$$

Avec :

P_{ech} : pesée échantillon (mg).

T : teneur réelle du produit (0.5mg).

PM : poids moyen théorique.

Matériel et méthodes

- **Calcul du taux d'impuretés individuelles et totales**

Le pourcentage des impuretés individuelles présentes dans Novonorm 0.5 mg est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ Impuretés individuelles} = \left(\frac{S_{\text{ech}}}{S_{\text{STD3}}} \right) \times \left(\frac{C_{\text{STD3}}}{C_{\text{ech}}} \right) \times 100$$

Avec :

S_{ech} : surface de chaque impureté dans la solution échantillon.

S_{STD3} : surface de la solution STD 3.

C_{STD3} : concentration du standard de répaglinide en solution STD 3 (mg/ml).

C_{ech} : concentration nominale du répaglinide dans la solution échantillon (mg/ml).

Le pourcentage des impuretés totales présentes dans Novonorm 0.5 mg est calculé comme suit :

$$\% \text{ Impuretés totales} = \sum \% \text{ Impuretés individuelles}$$

- **Limite d'exclusion :**

Les pics présentant une surface inférieure à la surface du pic principal obtenu après analyse de la solution 0.05%, ne sont pas pris en considération.

- **Critères d'acceptation**

- **Dosage du répaglinide**

En se référant à l'USP-44 et aux spécifications internes fixées par le laboratoire LMTO, la teneur en répaglinide doit être comprise entre 95% et 105% avec un pourcentage du RSD entre les deux échantillons (double détermination) inférieur ou égal à 2.4 %.

- **Dosage des impuretés**

Selon la monographie de l'USP-44 et selon les spécifications internes fixées par le laboratoire LMTO, le pourcentage des impuretés doit être :

✓ Impuretés individuelles : < 0.2%

✓ Impuretés totales : ≤ 0.5%

Matériel et méthodes

a. Conformité du système chromatographique

Les paramètres indiquant la conformité du système chromatographique dans l'essai du dosage du répaglinide et des impuretés sont décrits dans le tableau N°13.

Tableau N°13 : conformité du système chromatographique dans l'essai du dosage du répaglinide et des impuretés.

Paramètre	Dosage du répaglinide	Dosage des impuretés
Résolution (R)	≥ 7.0	≥ 7.0
Facteur de symétrie	0.8 – 2.0	0.8 - 2.0
RSD	≤ 2.0 % entre les 5 injections du STD2	≤ 10 % entre les 6 injections du STD2
	$< 2.4\%$ entre les deux échantillons	
Recouvrement entre STD2 et STD2 de contrôle	98 - 102%	-
Sensibilité de détecteur	-	> 10

3.2.2.6 Test de dissolution

Cette méthode permet de mesurer le taux de dissolution du répaglinide in vitro à partir des Cp de Novonorm 0.5 mg. L'essai a été effectué sur un dissolutest à palette décrit dans la pharmacopée européenne 10.0, dans une solution tamponnée de pH 5.0 et la quantification a été faite par HPLC après 30 min de dissolution (Dissolution offline).

a) Préparation des solutions tampons et de la phase mobile

- **Préparation du tampon pH 5.0 (milieu de dissolution) :**
 - Une prise d'essai de 10.2 g d'acide citrique monohydraté et 18.16 g de phosphate de sodium ont été séparément dissoutes dans 150 ml d'eau pour chromatographie à l'aide d'un agitateur magnétique.
 - Les deux solutions ont été transférées dans une éprouvette de 1000 mL et complétées avec de l'eau pour chromatographie jusqu'au trait de jauge avant d'être déplacées vers un Erlenmeyer de 1000 mL.
 - Le pH de la solution a été ajusté à un pH 5.0 par l'ajout de quelques gouttes d'acide phosphorique (H_3PO_4 85%).

Matériel et méthodes

- **Préparation du tampon pH 2.3** (*pour la phase mobile*) :

- Une prise d'essai de 1.5 g de Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) a été dissoute dans 30 mL d'eau pour chromatographie, et placés sous agitation jusqu'à dissolution complète.
 - La solution a été transférée dans une éprouvette de 1000 mL et complétée avec de l'eau pour chromatographie jusqu'au trait de jauge avant d'être déplacées vers un Erlenmeyer de 1000 mL.
 - Le pH de la solution a été ajusté à un pH 2.3 par l'ajout de quelques gouttes d'acide phosphorique (H_3PO_4 85%).
- ### - **Phase mobile :**
- Pompe A (40%) : Tampon pH 2.3
 - Pompe B (60%) : 900 mL d'acétonitrile ont été mélangés avec 200 mL du méthanol pendant 30 min à l'aide d'un agitateur magnétique.

b. Préparation des solutions standards

- **Préparation de la solution standard mère** (44 $\mu\text{g}/\text{mL}$) :

Dans une fiole jaugée de 250 mL, 11 mg du standard de répaglinide ont été dissouts dans 80 mL de méthanol. Ce mélange a été complété au trait de jauge avec le même solvant.

- **Préparation de la solution standard mère de contrôle** (44 $\mu\text{g}/\text{mL}$) :

La solution standard mère de contrôle a été préparée de façon identique à la solution standard mère.

- **Préparation de la solution standard 1** (2.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) :

- Dans une fiole jaugée de 100 mL, 5 ml de la solution standard mère ont été dilués dans 25 mL de méthanol. 40 mL du milieu de dissolution ont été ensuite ajoutés. Le tout a été laissé au repos dans un bain marie à 20°C pendant 1h.
- Le volume a été complété au trait de jauge avec le milieu de dissolution. La solution a été ensuite dégazée dans l'ultrason et remise dans le bain marie à 20°C pour quelques minutes.

- **Préparation de la solution standard 1 de contrôle** (2.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) :

- Dans une fiole jaugée de 100 mL, 5 mL de la solution standard mère de contrôle ont été dilués dans 25 mL de méthanol. 40 mL du milieu de dissolution ont été ensuite ajoutés. Le tout a été laissé au repos dans un bain marie à 20°C pendant 1h.

Matériel et méthodes

- Le volume a été complété au trait de jauge avec le milieu de dissolution. La solution a été ensuite dégazée dans l'ultrason et remise dans le bain marie à 20°C pour quelques minutes.
- **Préparation de la solution standard 2** (1.11 µg/mL) :

Un volume de 10 mL de la solution standard 1 a été dilué dans 20 mL du milieu de dissolution. La solution a été dégazée avant d'être complétée au trait de jauge.

- **Préparation de la solution standard 2 de contrôle** (1.11 µg/mL) :

Un volume de 10 mL de la solution standard 1 de contrôle a été dilué dans 20 mL du milieu de dissolution. La solution a été dégazée avant d'être complétée au trait de jauge.

- **Préparation de la solution standard 3** (0.55 µg/mL) :

Un volume de 5 mL de la solution standard 1 a été dilué dans 20 mL du milieu de dissolution. La solution a été dégazée avant d'être complétée au trait de jauge.

- **Préparation de la solution standard 3 de contrôle** (0.55 µg/mL) :

Un volume de 5 mL de la solution standard 1 de contrôle a été dilué dans 20 mL du milieu de dissolution. La solution a été dégazée avant d'être complétée au trait de jauge.

c. Préparation de la solution échantillon

- Six Cp de Novonorm 0.5 mg ont été prélevés au hasard (début, milieu et fin du lot) et séparément pesés.
- Chacun des six vases du dissolutest a été rempli à 900 mL avec le tampon pH 5.0.
- La température des vases a été réglée à $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ et la vitesse des palettes à 75 rpm.
- Lorsque la température des vases a atteint $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, un Cp a été placé dans chaque vase du dissolutest avant le lancement du test.
- Après 30 min de dissolution, il a été prélevé 10 mL de chaque vase.
- La solution ainsi obtenue a été filtrée à travers un filtre à membrane 0,45 µm.
- Un vial de chaque solution filtrée a été rempli et dosé par HPLC.

Les conditions opératoires et chromatographiques du test de dissolution se résument dans les tableaux N°14 et 15.

Matériel et méthodes

Tableau N°14 : conditions opératoires du test de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg.

Appareil de dissolution	Appareil à palettes
Nombre de comprimés	06 Cp
Milieu de dissolution	Tampon pH 5.0
Volume du milieu de dissolution	900 mL
Température de dissolution	37 ± 0.5°C
Vitesse de rotation des palettes	75 rpm
Temps de dissolution	30 min

Tableau N°15 : conditions chromatographiques dans le test de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg.

Equipement	
Système HPLC	Détecteur fluorimétrique
Logiciel	Empower
Colonne	Longueur : 12.5 cm
	Diamètre interne : 4.0 mm
	Porosité : 10 µm
Conditions opératoires	
Longueur d'onde	245 nm : excitation 348 nm : émission
Débit	1 mL/mn
Volume d'injection	20 µL
Température du four de la colonne	40°C
Temps d'analyse	6 minutes
Phase mobile	40% Pompe A et 60% Pompe B
Blanc	Tampon pH 5.0

Le tableau N°16 résume les différentes séquences d'injections dans l'essai de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg.

Tableau N°16 : séquence d'injections dans le test de dissolution des Cp Novonorm 0.5 mg.

Séquence d'injections	Nombre d'injections
Blanc	02 fois au début de la séquence 01 fois à la fin de la séquence
Solution STD	05 fois, répartie dans la séquence
Solutions de contrôle	03 fois, au début, au milieu et à la fin de la séquence
Solution échantillon	01 fois

- **Formules de calcul**

- **Concentration moyenne du répaglinide :**

La concentration moyenne du répaglinide a été déterminée selon la formule suivante:

Matériel et méthodes

$$\% \text{ Répaglinide} = \left(\frac{S_{\text{ech}}}{S_{\text{STD3}}} \right) \times \left(\frac{C_{\text{STD3}}}{L} \right) \times V$$

Avec :

S_{ech} : surface maximale de la solution échantillon.

S_{STD3} : surface moyenne des 5 injections de la solution STD3.

C_{STD3} : concentration du standard de répaglinide en solution STD3.

L : label claim of répaglinide / Dosage théorique (0.5mg).

V : volume du milieu dissolution.

• Critères d'acceptation

En se référant à l'USP-44, le test est conforme si le taux de dissolution du répaglinide contenu dans les Cp de Novonorm 0.5 mg est $\geq 70\%$ (Q).

Les exigences de l'essai de dissolution sont satisfaites si les quantités de PA sont conformes aux critères d'acceptation du tableau N°17. L'essai de dissolution doit être poursuivi à l'étape S2 si les résultats ne sont pas conformes dans l'étape S1.

Tableau N°17 : critères d'acceptations pour chaque niveau de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg.

Niveau	Nombre d'unités examinées	Quantité de principe actif dissoute Q(%)	Critères d'acceptations à 30 minutes
S ₁	6	70%	Aucune unité n'est inférieure à Q+5%
S ₂	6	70%	La moyenne des 12 unités (S1+S2) est égale ou supérieure à Q et aucune unité n'est inférieure à Q-15 %.

• Conformité du système chromatographique

Les paramètres indiquant la conformité du système chromatographique dans l'essai de dissolution sont décrits dans les tableaux N°18.

Tableau N°18 : conformité du système chromatographique dans l'essai de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg

Paramètre	Norme
Facteur de symétrie dans les solutions STD	0.5-2.0
Ecart-type relative sur les 5 injections de STD (RSD)	$\leq 2.0\%$
Recouvrement entre STD et solution de contrôle	95%-105%

3.2.2.7 Test de pureté microbienne

a) Préparation de la suspension :

Une suspension de 10 g du Novonorm 0.5 mg a été préparée dans 90 mL de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium stérile pH 7,0 en ajoutant un tween 80 pour faciliter la dissolution des Cp.

b) Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT)

- Norme : pas plus de 10^3 UFC/g
- Milieu de culture : TSA
- Nombre de boites de pétris : deux boites + Une boite de témoin négatif
- Technique d'ensemencement : en profondeur

Un volume de 1 mL de la suspension préparée précédemment a été introduit dans chacune des deux boites de pétris, 20 mL du milieu gélosé TSA ont été ajoutés. Le tout a été laissé sécher pendant 10 min avant l'incubation à 32.5°C pendant 3-5 jours.

Un témoin négatif a été préparé.

c) Dénombrement des levures et moisissure totales (DLMT)

- Norme : pas plus de 10^2 UFC/g
- Milieu de culture : gélose saboureux
- Nombre de boites : deux boites + Une boite de témoin négatif.
- Technique d'ensemencement : en profondeur.

Un volume de 1 mL de la suspension préparée précédemment a été introduit dans chacune des deux boites de pétris, 20 mL du milieu gélosé ont été ajoutés. Le tout a été laissé sécher pendant 10 min avant l'incubation à 22.5°C pendant 5-7 jours.

Un témoin négatif a été préparé.

d) Recherche *Escherichia coli*

- Norme : absence (0 ufc/g)
- Technique d'ensemencement : en surface.

Dans un flacon de 100 mL, 10 mL de la suspension préparée précédemment ont été ensemencés dans le milieu gélosé TSB, le tout a été incubé à 32.5°C pendant 24 heures.

- Sélection :

1 mL de la solution précédente (milieu TSB + suspension) a été ensemencé dans le milieu liquide Mac Conkey, puis incubée à 43°C pendant 48 heures.

Chapitre 4 :

résultats et discussion

4.1 Etude de la dégradation forcée du répaglinide

4.1.1 Dégradation Acide

La figure N°5 présente le chromatogramme obtenu pour l'identification des pics du répaglinide et de ses impuretés.

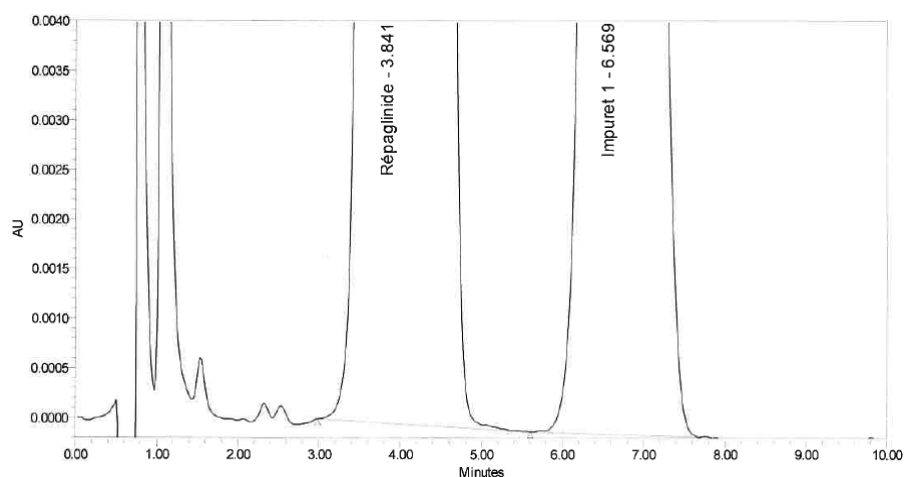


Figure N°5 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par l'acide chlorhydrique à 0.5N.

Le temps de rétention ainsi que l'aire du pic de l'impureté apparue après la dégradation acide sont résumés dans le tableau N°19.

Tableau N°19 : taux des impuretés après dégradation à pH acide

	Tr (min)	Aire du pic	Impureté en (%)	Norme	Résultat
Impureté 1	6.569	1775278	21.08	< 0.2	Non conforme et instable

Les résultats obtenus après la dégradation à pH acide a engendré une impureté à un taux très élevé avec un temps de rétention de 6.569 min, ceci indique que le répaglinide est très instable dans les conditions acides (HCl à 0.5N pendant 72 h).

4.1.2 Dégradation neutre

La figure N°6 présente le chromatogramme obtenu après l'analyse de la solution du répaglinide porté à reflux pendant 15h.

Résultats et discussion

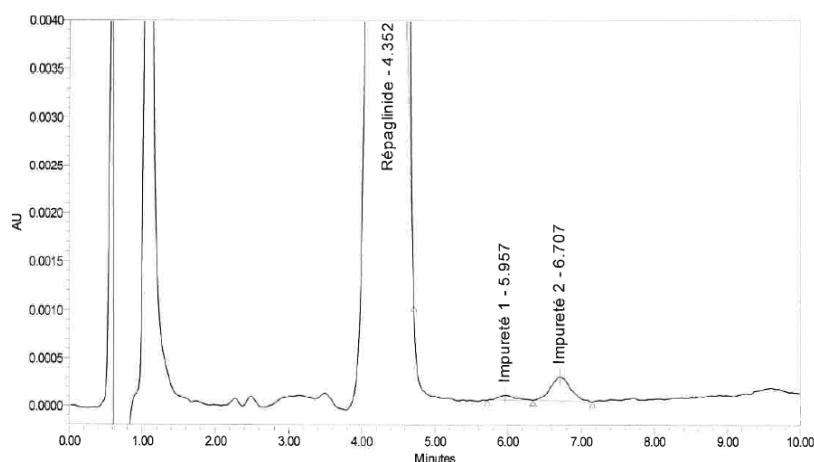


Figure N°6 : chromatogramme de la solution du répaglinide porté à reflux.

Les temps de rétention ainsi que les aires des pics des impuretés apparues après la dégradation neutre du répaglinide sont résumés dans le tableau N°20.

Tableau N°20 : taux des impuretés après une dégradation neutre

	Tr (min)	Aires des pics	Impureté en (%)	Norme	Résultat
Impureté 1	5.957	915	0.01	< 0.2	Conforme mais instable
Impureté 2	6.707	4932	0.06		
Total des impuretés			0.1	≤ 0.5	

Après la dégradation dans un milieu neutre, il y a eu apparition de deux impuretés avec des temps de rétention de 5.957 et 6.707, ses impuretés sont issues de la dégradation du répaglinide.

4.1.3 Dégradation oxydative

La figure N°7 présente le chromatogramme obtenu après l'analyse de la solution du répaglinide dégradée par le peroxyde d'hydrogène à 30%.

Résultats et discussion

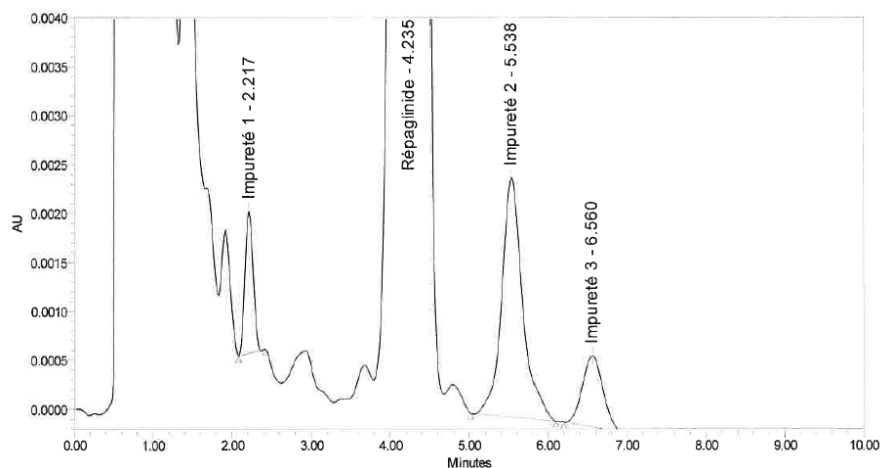


Figure N°7 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par le peroxyde d'hydrogène à 30%.

Le tableau N°21 présente les temps de rétention ainsi que les aires des pics des impuretés issues de la dégradation oxydative du répaglinide.

Tableau N°21 : taux des impuretés après une dégradation oxydative.

	Tr (min)	Aires des pics	Impureté en (%)	Norme	Résultat
Impureté 1	2.217	10394	0.1	< 0.2	Non conforme et instable
Impureté 2	5.538	45726	0.5		
Impureté 3	6.560	12983	0.2		
Total des impuretés			0.8	≤ 0.5	

Les résultats de l'étude de la dégradation oxydative montrent que le répaglinide est très sensible à l'oxydation (l'air), en effet, l'exposition à ces conditions de stress permet d'engendrer trois impuretés dont les temps de rétention sont 2.217/5.538/6.560 à des proportions différentes, avec une diminution remarquable de la surface du pic du répaglinide.

4.1.4 Dégradation photolytique

La figure N°8 présente le chromatogramme obtenu après l'analyse de la solution du répaglinide dégradée par une lumière UV.

Résultats et discussion

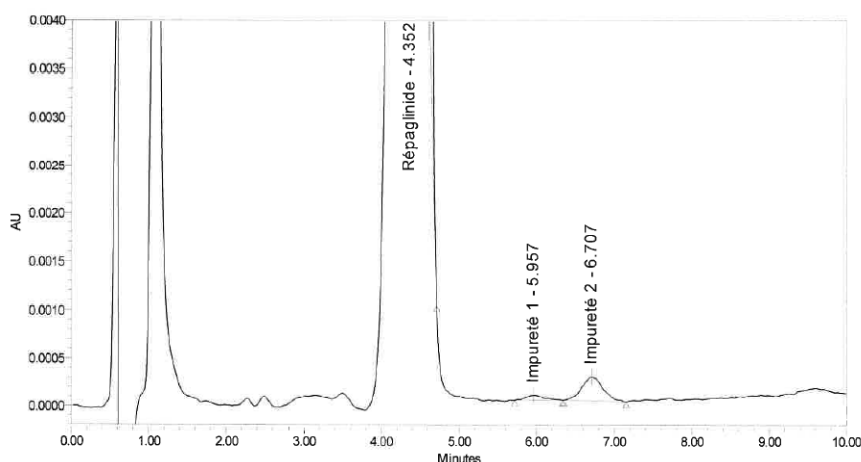


Figure N°8 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par une lumière UV. La figure N°9 (b) présente l'aspect de l'échantillon du répaglinide après l'avoir retiré de la chambre à UV (après 10 jours de dégradation).

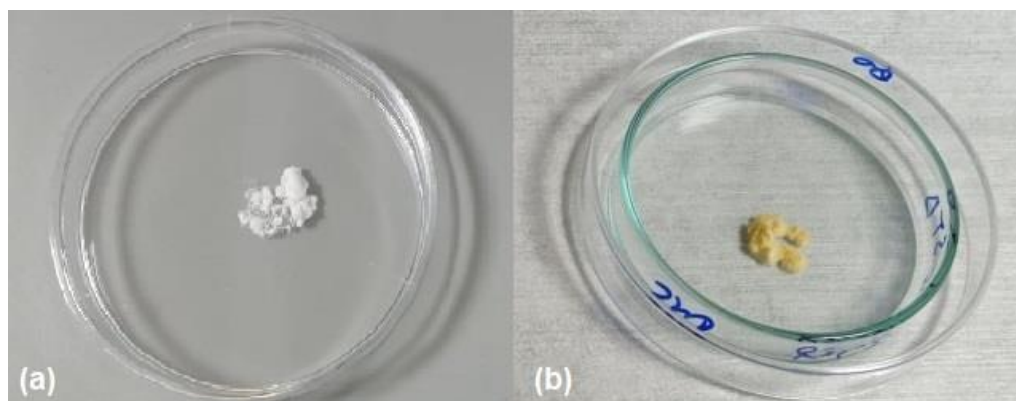


Figure N°9 : image photographiée de l'aspect de l'échantillon du répaglinide avant (a) et après (b) dégradation par une lumière UV.

Le tableau N°22 montre les temps de rétention ainsi que les aires des pics des impuretés issues de la dégradation photolytique du répaglinide.

Tableau N°22 : taux des impuretés après une dégradation par la lumière UV.

	Tr (min)	Aires des pics	Impureté en (%)	Norme	Résultat
Impureté 1	5.887	2222	0.03	< 0.2	Conforme mais instable
Impureté 2	6.628	3667	0.04		
Total des impuretés			0.1	≤ 0.5	

Les résultats de l'étude de la dégradation photolytique montrent que le répaglinide est sensible à la lumière. Effectivement, on constate un changement de couleur dans l'échantillon ainsi

Résultats et discussion

que l'apparition de pics autres que celui du répaglinide, correspondant à des impuretés, avec une diminution de la surface du pic du répaglinide.

L'exposition à ces conditions de stress engendre deux impuretés dont les temps de rétention sont 5.887 et 6.628 à des proportions différentes.

4.1.5 Dégradation basique et thermique

Les figures N°10 et N°11 présentent respectivement, les différents chromatogrammes obtenus après l'analyse de la solution du répaglinide dégradée par une base et par la chaleur.

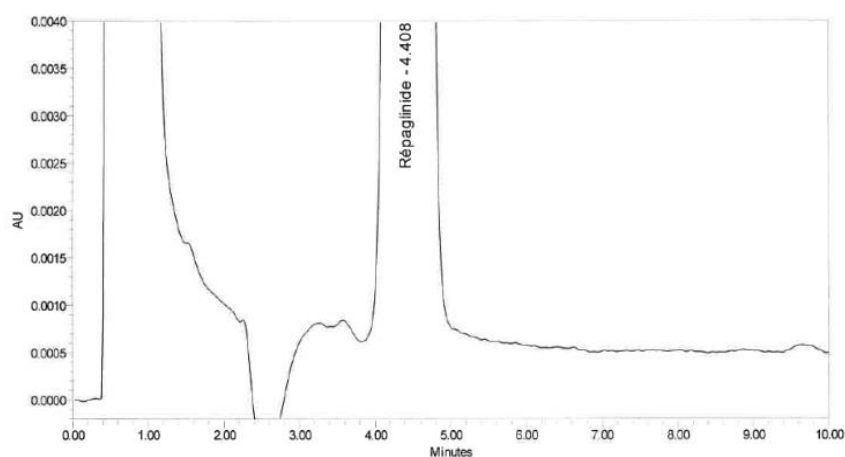


Figure 10 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par une base.

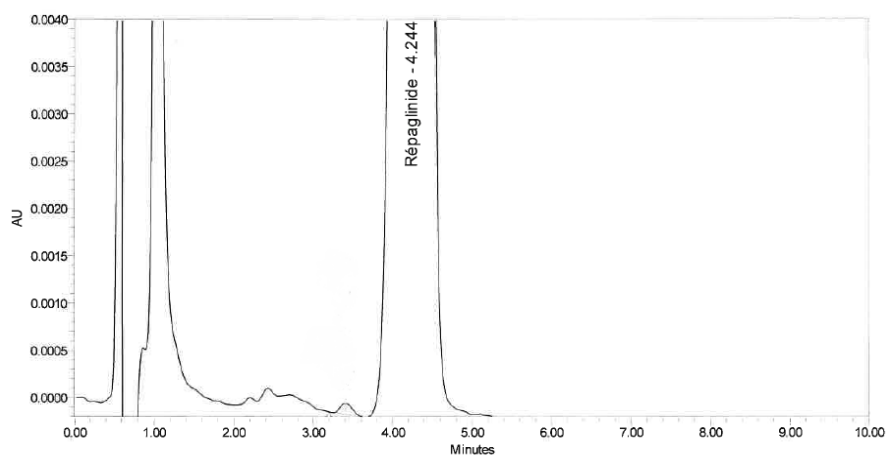


Figure 11 : chromatogramme de la solution du répaglinide dégradée par la chaleur.

L'analyse chromatographique des deux échantillons soumis à une dégradation basique et thermique révèle :

- Absence de pics correspondant à des impuretés.
- La surface du pic du répaglinide est restée la même.

De ce fait, on peut conclure que le répaglinide demeure stable dans les conditions de stress basique et thermique.

Résultats et discussion

NB : Les chromatogrammes non zoomés des figures N°5, 6, 7, 8, 9,10 et 11 sont présentés dans l'annexe III.

Discussion

Les résultats de l'étude de la dégradation forcée montrent que le répaglinide est très sensible à la lumière, à l'air et à l'hydrolyse en milieu acide et neutre. En effet, l'exposition à ces conditions de stress engendre huit impuretés à des proportions différentes. Toutefois, la dégradation hydrolytique par la base et la dégradation par la chaleur n'induisent pas la formation d'impuretés.

Il est toutefois bon de signaler qu'une étude effectuée dans les mêmes conditions en Inde à l'institut national d'éducation et de recherche pharmaceutique (NIPER) a montré que le répaglinide se dégrade dans les conditions hydrolytiques (acide/base/neutre), oxydatives et photolytiques, il demeure cependant stable dans les conditions thermiques [45].

4.2 Étude de la stabilité de Novonorm 0.5 mg dans les conditions accélérées (à T0, T3 et T6)

4.2.1 Aspect

Les résultats du contrôle de l'aspect des 20 Cp de Novonorm 0.5 mg à T0, T3 et T6 sont résumés dans le tableau N°23.

Tableau N°23 : résultats du contrôle de l'aspect des 20 Cp de Novonorm 0.5 mg.

Temps	Forme ronde biconvexe	Couleur blanchâtre	Gravure du logo NOVO NORDISK sur une face	Barre de cassure	Cassures de choc	Résultats
T0	+	+	+	-	-	Conforme
T3	+	+	+	-	-	
T6	+	+	+	-	-	

(Signe + : présence ; signe - : absence)

L'observation visuelle des 20 Cp prélevés du lot de Novonorm 0.5 mg à T0, T3 et T6 montre que les Cp contrôlés répondent aux spécifications internes fixées par le laboratoire LMTO ; tous les Cp contrôlés présentent une uniformité d'aspect avec absence d'anomalies. On peut alors conclure que les Cp de Novonorm 0.5 mg ne présentent pas de défauts de fabrication ou de conservation visibles à l'œil nu, ils sont donc conformes.

Résultats et discussion



Figure N°12 : image photographiée des 2 faces et du côté du Cp novonorm 0.5 mg (à T6)

4.2.2 Test de dureté

Le test de dureté a été réalisé sur 10 Cp du lot de Novonorm 0.5 mg. Les résultats du test de duretés à T0, T3 et T6 sont regroupés dans le tableau N°24.

Tableau N°24 : résultat du test de dureté (en Newton) à T0, T3 et T6.

Temps	Dureté (N)			Norme	Résultat
	Max	Moy	Min		
T0	52	48	42	20 - 80	Conforme
T3	49	46	39		
T6	-	44	-		

D'après les résultats du tableau N°24, on constate que la dureté moyenne des Cp a légèrement diminuée à T3 et T6, bien que cette diminution reste dans l'intervalle de conformité qui est de 20 - 80 N. De ce fait, on peut conclure que le test est conforme aux spécifications pendant toute la période de l'étude.

4.2.3 Perte à la dessiccation (LOD)

Les résultats du test de la perte à la dessiccation sont résumés dans le tableau N°25.

Tableau N°25 : résultat du test de perte à la dessiccation à T0, T3 et T6.

Temps	Quantité de la poudre initiale avant la dessiccation (g)	Quantité de la poudre initiale après la dessiccation(g)	La perte à la dessiccation (%)	Norme	Résultat
T0	2	1.938	3.1	≤ 6.0	Conforme
T3	2	1.942	2.9		
T6	2	1.932	3.4		

Les résultats obtenus à T0, T3 et T6 sont largement ≤ 6.0 %, ce qui signifie que le test est conforme aux spécifications durant toute la période de l'étude.

Résultats et discussion

4.2.4 Identification, dosage du principe actif et des impuretés

4.2.4.1 Identification du répaglinide

L'essai a été réalisé uniquement à T0.

La comparaison du chromatogramme de la solution échantillon avec le chromatogramme du standard montre l'existence d'une similitude dans le temps de rétention et l'air des pics de l'échantillon analysé avec celui du standard 2. Il nous est donc permis de conclure que les Cp de Novonorm 0.5 mg contiennent du répaglinide.

4.2.4.2 Dosage du répaglinide

Le dosage de la solution standard et de la solution échantillon a été fait par HPLC. Le tableau 26 regroupe les résultats de l'essai de dosage du répaglinide contenu dans Novonorm 0.5 mg.

Tableau N°26 : résultat du test de dosage du répaglinide à T0, T3 et T6.

	T0	T3	T6	Norme	Résultat
Dosage (%)	102.2	98.6	99.9	95.0-105.0	Conforme

L'étude des résultats obtenus dans le tableau N°26 montre que la teneur en répaglinide dans les Cp analysés est dans les normes établies par l'USP-44 ; [95.0% – 105.0%]. On conclut alors, que la teneur en PA est conforme aux spécifications pendant toute la période de l'étude.

4.2.4.3 Dosage des impuretés

Le dosage des impuretés retenues dans les Cp de Novonorm 0.5 mg a été effectué par HPLC. Les résultats obtenus à T0, T3 et T6 sont résumés dans le tableau N°27 suivant.

Tableau N°27 : résultat du test de dosage des impuretés à T0, T3 et T6.

Pourcentage / temps	T0	T3	T6	Norme	Résultat
Impuretés individuelles (%)	< 0.05	0.1	0.1	< 0.2	Conforme
Impuretés totales (%)	< 0.05	0.1	0.2	≤0.5	

Les résultats obtenus sont satisfaisants aux exigences de l'USP-44, toutes les valeurs trouvées sont comprises dans l'intervalle de conformité.

4.2.5.1.1 Exemple des pics d'une séquence d'analyse à T6

- Présentation sur figure N°13 des 6 chromatogrammes correspondant aux 6 injections du STD3

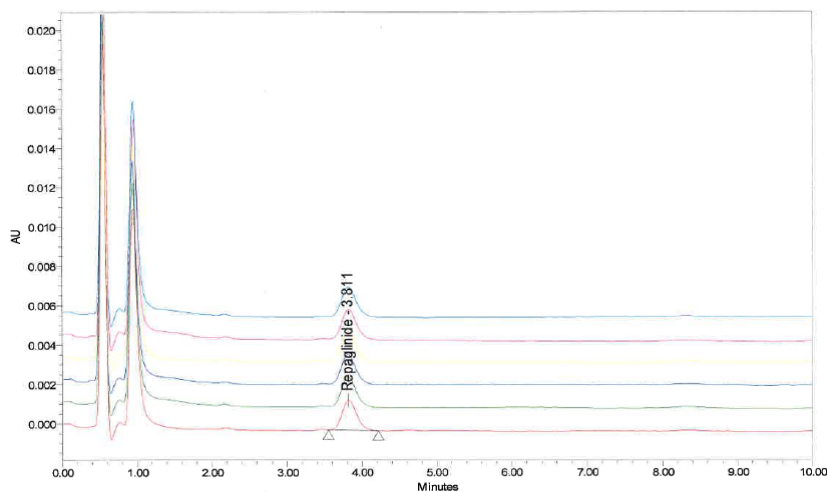


Figure N°13 : les 6 chromatogrammes correspondant aux 6 injections de la STD3

Les 6 chromatogrammes correspondant aux 6 injections du STD3 présentent une moyenne des aires de 20399. Ils présentent également un RSD $\leq 10\%$, ce qui indique la bonne répétabilité de l'injecteur du système.

- Le chromatogramme obtenu de la solution SST montre deux pics : l'un révélant la présence de l'impureté MPPBA, l'autre la présence du repaglinide (voir figure N°14). Ces deux pics montrent une bonne résolution, $\geq 7,0$.

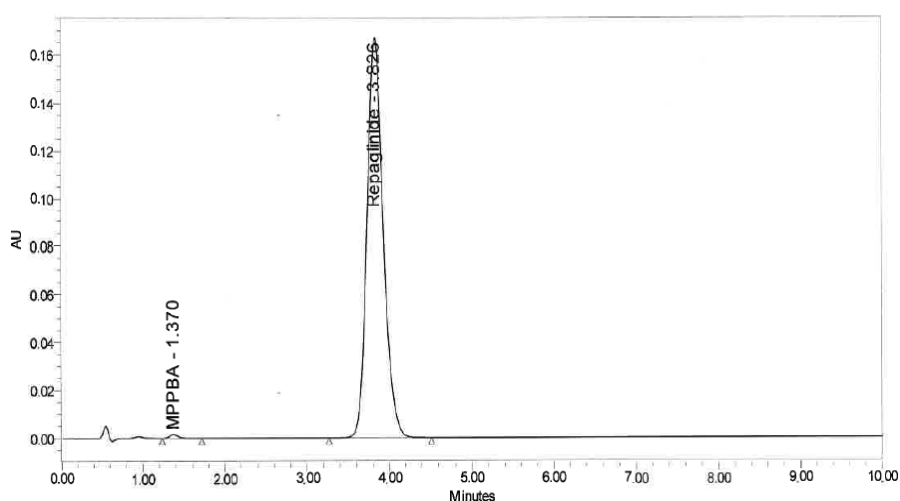


Figure N°14 : chromatogramme de la solution SST.

Les temps de rétention et les aires des pics obtenus à partir du chromatogramme de la solution SST sont illustrés dans le tableau N°28.

Résultats et discussion

Tableau N°28 : temps de retentions et aires des pics de la solution SST.

Nom du pic	Temps de retentions (min)	Aire du pic
MPPBA	1.370	11038
Répaglinide	3.826	2297222

- Dans le chromatogramme obtenu après analyse de la solution échantillon (figure N°15), on remarque que le pic correspondant au répaglinide de la solution examinée est apparu avec un même temps de rétention que la solution SST. On remarque également :
 - Absence du pic de l'impureté MPPBA.
 - Apparition de 3 nouveaux pics à des temps de rétention de **3.080 min**, **5.163** et **5.847 min** respectivement, ce qui correspond à des impuretés inconnues.

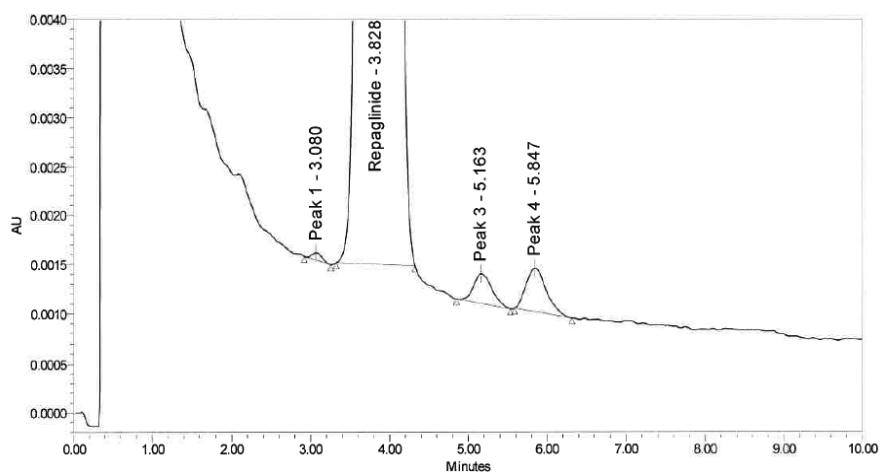


Figure N°15 : chromatogramme de la solution échantillon.

Les temps de rétention et les aires des pics obtenus après analyse de la solution échantillon sont illustrés dans le tableau N°29.

Tableau N°29 : Temps de retentions et aires des pics de la solution échantillon.

Nom du pic	Temps de retentions (min)	Aire du pic
Impureté 1	3.080	645
Répaglinide	3.828	8244975
Impureté 2	5.163	4846
Impureté 3	5.847	7916

Résultats et discussion

- A partir des données de l'analyse chromatographique (figures 13, 14 et 15), il est possible de calculer les pourcentages des impuretés individuelles et totales :

- **Calcul** : *Impureté 1 (impureté individuelle)*

$$\% \text{ Impureté } 1 = \left(\frac{S_{\text{ech}}}{S_{\text{STD3}}} \right) \times \left(\frac{C_{\text{STD3}}}{C_{\text{ech}}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ Impureté } 1 = \left(\frac{645}{20399} \right) \times \left(\frac{0.0002}{0.080} \right) \times 100$$

$$\% \text{ Impureté } 1 = 0.01 < 0.2 \text{ \% (conforme)}$$

Les impuretés 2 et 3 sont calculées de manière identique au calcul de l'impureté 1, la somme des 3 impuretés donnera le taux des impuretés totales. Le tableau N°30 regroupe le taux des différentes impuretés retenues dans la solution échantillon analysée à T6.

Tableau N°30 : taux des impuretés dans la solution échantillon à T6.

	Valeurs calculées	Normes	Résultats par impureté	Résultat final
Impureté 1 (%)	0.01	< 0.2	Conforme	Conforme
Impureté 2 (%)	0.06		Conforme	
Impureté 3 (%)	0.10		Conforme	
Impuretés totales(%)	0.2	≤0.5	Conforme	

4.2.6 Test de dissolution

L'essai de dissolution a été réalisé sur 6 Cp du lot de Novonorm 0.5 mg sur un dissolutest a palettes, après 30 min de dissolution, des prélèvements du liquide ont été effectués à partir des orifices de l'appareil, des Vial pour HPLC on été ensuite remplis et soumis à l'analyse.

Les résultats obtenus pour cet essai sont présentés dans le tableau N°31.

Tableau N°31: résultat du test de dissolution à T0, T3 et T6

	T0	T3	T6	Norme	Résultat
Dissolution en (%)	93.4	100.5	99.4	≥ 70% à 30min	Conforme

Les résultats obtenus à différents temps (T0, T3 et T6) montrent qu'après 30 minutes de dissolution, plus de 70 % du répaglinide a été libéré de sa forme galénique et passé en

Résultats et discussion

solution. De ce fait, on peut dire alors que ces résultats sont satisfaisants aux spécifications de l'USP-44.

4.2.6.1 Exemple des pics d'une séquence d'analyse à T6

- Le chromatogramme correspondant à l'injection de la solution échantillon 1 est présenté sur la figure N°16.

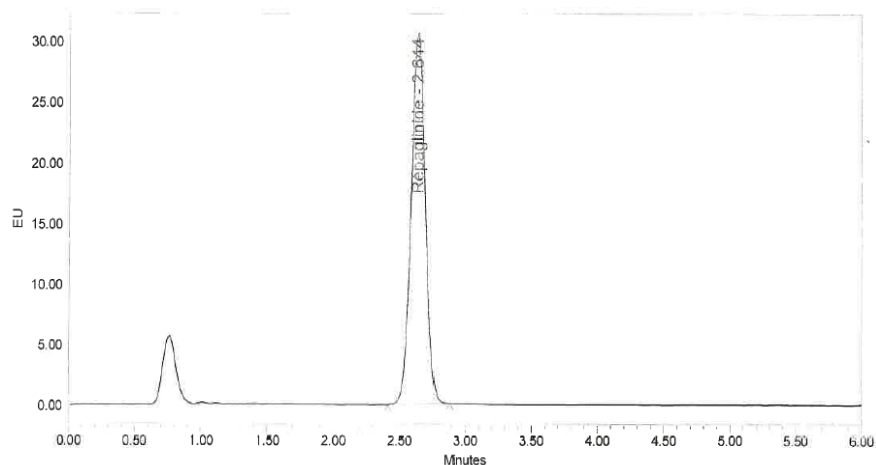


Figure N°16 : chromatogramme de la solution échantillon 1.

- Les temps de rétention et les aires des pics des 6 échantillons analysés par HPLC sont représentés sur le tableau N°32.

Tableau N°32 : temps de rétention et aires des pics des 6 échantillons analysés

Cp	Temps de rétention (min)	Aires des pics
1	2.644	2267140
2	2.645	2161135
3	2.642	2208751
4	2.644	2236946
5	2.644	2313251
6	2.643	1899303

- Les 5 injections du STD3 présentent une moyenne des aires de 2197736,3. Ils présentent également un RSD $\leq 2.0\%$, ce qui indique la bonne répétabilité de l'injecteur du système.
- Le recouvrement entre la solution STD3 et la solution STD 3 de contrôle est de 96.7%, cette valeur appartient à l'intervalle de conformité établie par le laboratoire LMTO

Résultats et discussion

(95.0%–105.0%), par conséquent, la méthode de dosage du répaglinide dans les échantillons prélevés du milieu de dissolution est exacte.

- **Calcul :**

$$\% \text{ Répaglinide} = \left(\frac{S_{\text{ech}}}{S_{\text{STD3}}} \right) \times \left(\frac{C_{\text{STD3}}}{L} \right) \times V \times 100$$

$$\% \text{ Répaglinide} = \left(\frac{2313251}{2197736,3} \right) \times \left(\frac{0.00055}{0.5} \right) \times 900 \times 100$$

$$\% \text{ Répaglinide} = 99 \% \in [95.0\% - 105.0\%]$$

4.2.7 Test de la pureté microbienne

Les résultats obtenus du test de la pureté microbienne des Cp de Novonorm 0.5 mg à T0 et T6 sont illustrés dans le tableau N°33.

Tableau N°33 : résultats des tests microbiologiques.

	Normes	T0	T6	Résultats
Dénombrement des germes Aérobie totaux (cfu/g)	≤ 1000	0	50	Conforme
Dénombrement des levures et moisissures totales (cfu/g)	≤ 100	0	90	
<i>Escherichia coli</i>	Absence totale	Absence /g	Absence /g	

Au vu des résultats obtenus, on remarque :

- Absence totale de germes aérobie totaux et des levures et moisissures.
- La recherche d'*E. coli* a marqué l'absence totale des colonies rouges non colloïdes et par conséquent l'absence d'*E. coli*.

On peut alors dire que l'ensemble des échantillons analysés de Novonorm 0.5 mg sont conforme aux exigences adoptées par le laboratoire LMTO et reste stable tout au long de l'étude.

4.2.8 Tendances des analyses de l'étude de stabilité accélérée (T0, T3, T6)

Les paramètres physicochimique et biopharmaceutique réalisés lors de l'étude de stabilité accélérée de Novonorm 0.5 mg ont été évaluées après 06 mois de stockage à 75 ° C / 40%

Résultats et discussion

HR, en répondant à la question suivante : Le dernier résultat est-il comparable avec les résultats précédemment observés pour le même lot dans l'étude ?

1.1 Dureté

La courbe de tendance obtenue du test de dureté est représentée dans la figure N°17.

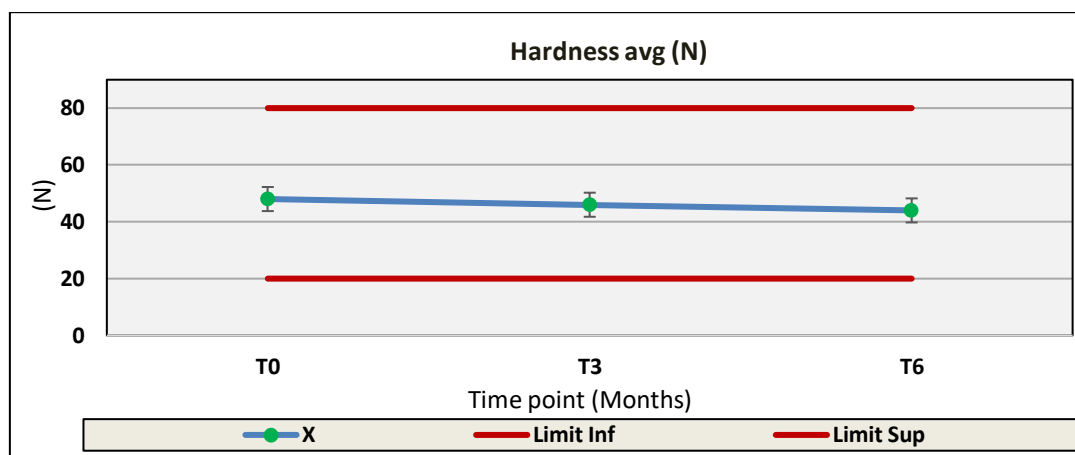


Figure 17 : tendance du test de dureté.

La dureté à T0 est de 48N. Après 3mois, elle est de 46 N. En tenant compte du fait qu'un écart-type de 1.41 est observé, on peut s'attendre à une dureté de 50.23% (écart-type*3+T3= 1.41*3+46= 50.23) à 06 mois.

Le résultat de 44N obtenu à 06 mois est dans la tendance.

1.2 Perte à la dessiccation

La courbe de tendance obtenue du test de perte à la dessiccation est représentée dans la figure N°18.

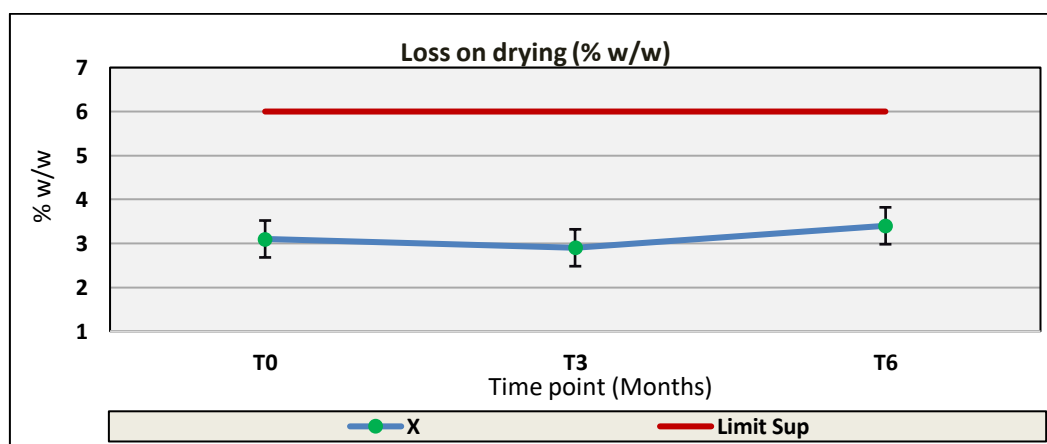


Figure 18 : tendance du test de perte à la dessiccation.

Résultats et discussion

La perte à la dessiccation à T0 est de 3.1%. Après 3 mois, elle est de 2.9%. En tenant compte du fait qu'un écart-type de 0.41 est observé, on peut s'attendre à une perte à la dessiccation de 4.13% à 06 mois.

Le résultat de 3.4% obtenu à 06 mois est dans la tendance.

1.3 Dosage

La courbe de tendance obtenue du test de dosage du répaglinide est illustrée dans la figure N°19.

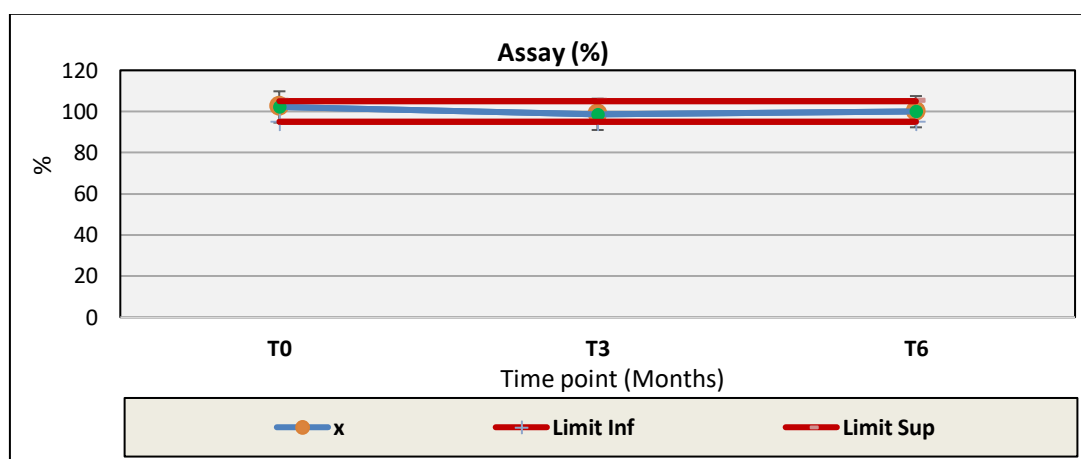


Figure 19 : tendance du test de dosage.

La teneur en répaglinide dans les Cp de Novonorm 0.5 mg à T0 est de 102.2%. Après 3 mois, elle est de 98.6%. En tenant compte du fait qu'un écart-type de 2.55 est observé, on peut s'attendre à une teneur en répaglinide de 106.25% à 06 mois.

Le résultat de 99.9% obtenu à 06 mois est dans la tendance.

1.4 Total des impuretés

La courbe de tendance obtenue du test de dosage des impuretés de Novonorm 0.5 mg est représentée dans la figure N°20.

Résultats et discussion

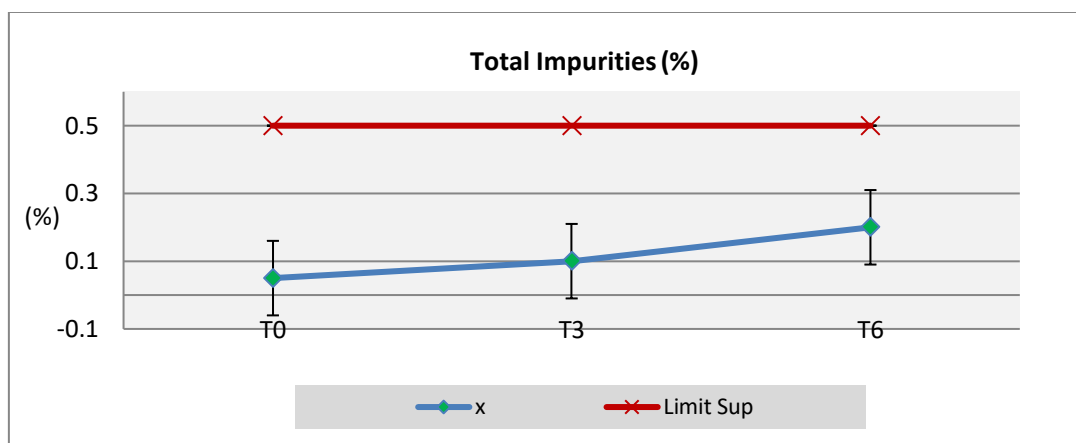


Figure 20 : tendance du test de dosage des impuretés.

Le pourcentage des impuretés totales contenues dans les Cp de Novonorm 0.5 mg à T0 est de 0.05%. Après 3 mois, il est de 0.1%. En tenant compte du fait qu'un écart-type de 0.04 est observé, on peut s'attendre à des impuretés totales de 0.22% à 06 mois.

Le résultat de 0.2% obtenu à 06 mois est dans la tendance.

1.5 Dissolution

La courbe de tendance obtenue du test de dissolution des Cp de novonorm 0.5 mg est illustrée dans la figure N°21.

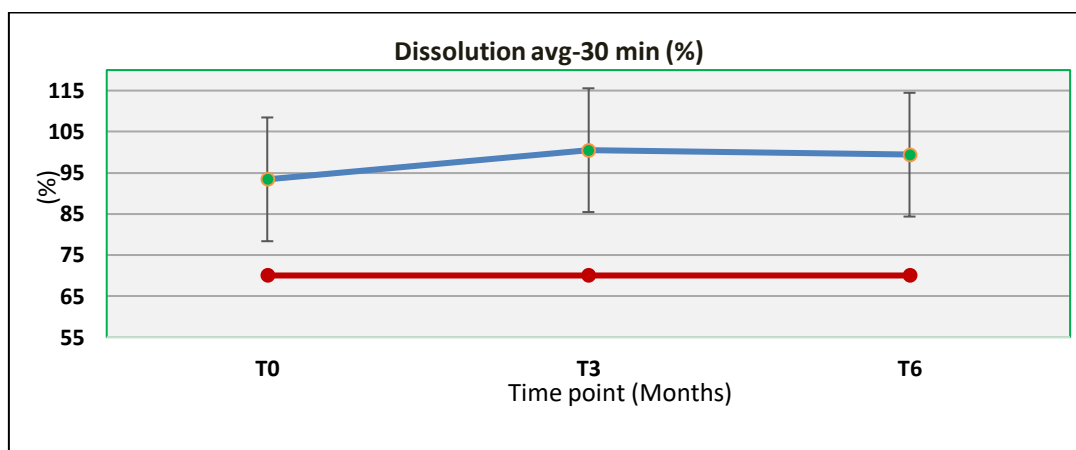


Figure 21 : tendance du test de dissolution.

Le taux de dissolution des Cp de Novonorm 0.5 mg après 30 min à T0 est de 93.4%. Après 3 mois, il est de 100.5%. En tenant compte du fait qu'un écart-type de 5.02 est observé, on peut s'attendre à un taux de dissolution de 115.5% à 06 mois.

Le résultat de 99.4% obtenu à 06 mois est dans la tendance.

Conclusion

Conclusion

Cette étude a été menée dans le but de recueillir des données sur la sensibilité du principe actif « répaglinide » à l'hydrolyse, l'oxydation, la lumière et la chaleur et afin de prouver que le produit fini « Novonorm 0.5 mg » est stable tout au long de sa durée de validité. Pour ce faire une étude de dégradation forcée a été conduite sur le répaglinide tandis qu'une étude de stabilité accélérée a été réalisée sur le produit fini « Novonorm 0.5 mg ».

L'étude de la dégradation forcée du répaglinide a montré une sensibilité notable du répaglinide à la lumière, d'où la nécessité de le conserver à l'abri de celle-ci. Nous avons prouvé également sa sensibilité à l'air et à sa dégradation en milieu acide. Par conséquent, lors de sa formulation, l'emploi d'agents antioxydants est nécessaire pour remédier à sa sensibilité à l'air et l'emploi d'excipients acides est absolument à éviter en raison de sa dégradation en milieu acide.

Il serait intéressant de poursuivre ce travail par le développement d'une méthode analytique appropriée permettant de détecter les produits de dégradation générés par le processus de la dégradation forcée. Pour avoir plus d'information sur ces impuretés, il serait également intéressant d'avoir recours à la HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS).

L'étude de stabilité des comprimés de Novonorm 0.5 mg dans des conditions accélérées, nous a permis de constater que les tests physico-chimiques, microbiologiques et biopharmaceutiques effectués se sont tous avérés conformes. A partir de cette constatation, il est aisé de conclure que le Novonorm 0.5 mg est conforme aux exigences de la pharmacopée américaine, donc stable durant toute sa durée de validité.

Cependant, il serait souhaitable que notre étude sur la stabilité de Novonorm 0.5 mg dans des conditions accélérée soit ultérieurement complétée par une étude de stabilité dans des conditions réelles, avant sa libération sur le marché.

Références bibliographiques

[1] Rédaction AE, 2021. Novonordisk Algérie : 20 millions de doses d'insuline produites par an à Tizi-Ouzou. *Algerie Eco* [en ligne]. 21/05/2021. [Consulté le 03/06/2021]. Disponible sur : <https://www.algerie-eco.com/2021/05/21/novo-nordisk-algerie-20-millions-de-doses-d-insuline-produites-par-an-a-tizi-ouzou/> .

[2] SITE OFFICIEL Novonordisk Algérie.

[3] Cen L and Ye J. 2012. Current analysis of Repaglinide enantiomers in Pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis using 2,6-Di-o-methyl- β -cyclodextrin as a chiral selector. *Journal of Chromatographic Science*, Vol50, P.739–743.

[4] Pharmacopée européenne édition 10.0, 2019.

[5] National library of medicine, Pubchem.2005. Répaglinide. 03/07/2021. [Consulté le 06/07/2021]. Disponible à l'adresse : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Repaglinide>.

[6] PAYEN Nicolas.2005. Les anomalies dans le circuit des médicaments thermosensibles à l'hôpital. Mémoire de Pharmacien inspecteur de santé publique. Ecole nationale de la santé publique, Rennes.

[7] International conference of harmonisation. ICH Q1A (R2) : Stabilité testing of new drug substances and product.2016.

[8] United states pharmacopeia. Stability considerations in dispensing practice [en ligne]. Disponible sur : <http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1191.html >. (Consulté le 02.06.2021).

[9] KHALIFA Nagwa.2010. Empirical and kinetic models for the determination of Pharmaceutical product stability. Thesis applied science in chemical engineering. University of Waterloo, Waterloo.

[10] DURAFOR Pierre-Antoine.2020. L'importance des études de stabilité dans le domaine pharmaceutique : Qualité, réglementations et processus général. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie. Université Claude Bernard, Lyon.

[11] ICH. The ICH official website [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.ich.org/> >. (Consulté le 04.06.2021).

[12] Brossard D and al. 2013. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. France: Société Française de pharmacie clinique.

[13] Allenl V. compounding, stability and beyond-use dates. *Secundum artem current & practical compounding information for the pharmacist*. 7, 03, p1–6.

[14] VIDJRO Sandra.2015. Etude de stabilité chimique d'un médicament entamé : cas d'un sirop de paracetamol. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie. Université Mohammed V, Rabat.

[15] DAHMEN Wiem, 2013. Etude des interactions physicochimiques des bétabloquants avec les excipients [En ligne]. Diplôme national d'ingénieur. INSAT. [Consulté le 12/06/2021]. Disponible sur : https://www.memoireonline.com/01/16/9384/m_Etude-des-interactions-physicochimiques-des-bétabloquants-avec-les-excipients1.html.

[16] SCODELLARO Antoine, 2013. Revue du processus des études de stabilité dans l'industrie pharmaceutique : de la réglementation à la réalisation et jusqu'à l'exploitation des tendances observées. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie. Université de Rouen.

[17] Besse-Bardot I and al. 2010. Étiquetages et conditionnements des médicaments de la Pharmacie centrale des armées : garantir le bon usage et adapter le développement pharmaceutique aux contraintes opérationnelles. *Pratique médico-militaire*, 39, 1, p71-80.

[18] Ravisankar P and al, 2017. Current Trends in Performance of Forced Degradation Studies and Stability Indicating Studies of Drugs. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12, 6, p17-36.

[19] Baertschi W. 2005. Pharmaceutical stress testing predicting drug dégradation. Taylor & Francis Group. p613.

[20] Document interne à LMTO : Gestion des échantillons et données de stabilité.

[21] International conference of harmonisation. ICH Q6A : Spécifications : Méthodes analytiques et critères d'approbation pour les nouvelles substances médicamenteuses et les nouveaux produits pharmaceutiques. 2016.

[22] OUNAS, 2016. Méthodes pharmacopées: Chimie Analytique. Cours. Alger. 2015/ 2016.

[23] BERBOUCHI Loubna. 2010. Optimisation du test de dissolution a l'aide de la méthodologie des plans d'expériences : Cas de l'amlodipine comprimé. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie. Université Mohammed V, Rabat.

[24] Le Hir A. Chaumeil J. Brossard D. 2009. Pharmacie galénique. Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 9^{ème} Ed. Paris: Masson.

[25] Pharmacopée européenne 6^{ème} Ed ; 2007 - Version électronique.

[26] Desmeules J. 2003. Date de péremption et stabilité des médicaments. *Fondation Pharma-Flash*, 30, 6, p.21-24.

[27] Nicolle I. Pangault C. 1998. Dates limites d'utilisation des médicaments. *Bulletin d'information du médicament et de pharmacovigilance*.

[28] Swaroop A. Varun D. 2011. Aglimpse on expiry date of pharmaceutical Dosage forms. *PHARMANEST - An International Journal of Advances In Pharmaceutical Sciences* .September–December-2011. 02, p.423-433.

[29] P.Herné. 2012. La conservation des médicaments. Cours. Université de Liège.

- [30] Mourad Wafaa.2009. Dégradation forcée du docetaxel. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie. Université Mohammed V,Rabat.
- [31] Ladram A.Camus G. 2012. La chromatographie. Planet vie[en ligne]. 15/05/2012. [Consulté le 06/07/2021]. Disponible sur : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-chromatographie>.
- [32] SPIP AC ROUEN. 2010. HPLC principe et appareillage[en ligne]. 20/01/2010.[Consulté le 09/07/2021]. Disponible sur : <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9> .
- [33] Kostarnoi A and al.2007. High-Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Multi component Pharmaceutical Preparations. Journal of Analytical Chemistry.63, 6, p.566–580.
- [34] FUSS Damien.2016. Mise au point et étude de stabilité physico-chimique et microbiologique d'une forme orale liquide de Nicardipine à visée pédiatrique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Rouen .UFR de médecine et de pharmacie.
- [35] Administrateur, 2020. Chromatographie liquide à haute performance. Chimie analytique [en ligne]. 08/04/2021. [Consulté le 13/07/2021]. Disponible à l'adresse : <https://chimieanalytique.com/chromatographie-liquide-haute-performance-hplc/>.
- [36] La chimie pour tous, Chaîne d'HPLC (instrumentation). La chimie.fr [en ligne]. [Consulté le 13/07/2021]. Disponible à l'adresse : <https://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/HPLC/chaine-HPLC.php> .
- [37] Techniques Chromatographiques, 2019. Méthodes d'Analyses. Biotechnologie et Valorisation des Plantes. Cours. Université Ferhat Abbas Sétif -1.
- [38] L. Azzouz.2020.Chromatographie liquide à haute performance « CLHP - HPLC ».cours. Université Blida 1.
- [39] Douglas Skoog.2003. Principes d'analyse instrumentale.5^{ème} Ed. Bruxelles. P.701-710. ISBN 2-7445-0112-3.
- [41] : N.Boutaghene.2019. Les techniques Chromatographiques : Techniques d'Analyses. Cours. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- [42] Rouessac F. Rouessac A.2004. Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6^{ème} Ed. Paris : Dunod.
- [43] F. Ayati .2020.Appareillage des principaux tests pharmacotechniques.Cours. Université mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.
- [44] Pharmacopée Américaine édition 44, 2021.
- [45] Joshi S. Nahire R and al.2012. Validated stability-indicating rp-hplc uv method for simultaneous determination of metformin and repaglinide. National institute of pharmaceutical education and research (NIPER), 24,3, p.419–432.

Annexes

Annexe I : méthodes analytiques

Annexe I : méthodes analytiques

La chromatographie est une méthode d'analyse chimique permettant la séparation de plusieurs constituants présents dans un mélange. Elle consiste à faire migrer les constituants à séparer sur une phase stationnaire, à l'aide d'une phase mobile, liquide ou gazeuse, de nature différente [31].

Parmi les techniques chromatographiques les plus utilisées en industrie pharmaceutique on trouve, la Chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

I. Chromatographie liquide à haute performance : HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est l'une des techniques d'analyses les plus employées dans les laboratoires de contrôle qualité pharmaceutique en raison de sa fiabilité, sa reproductibilité et sa robustesse, mais également en vue de sa capacité d'identifier, de doser et de séparer des mélanges souvent non réussis par d'autres techniques ; la chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse [32,33].

1 Principe

La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase mobile liquide contenant un échantillon constitué d'un mélange de composés à séparer, ce mélange de molécules est introduit dans cette phase mobile et interagira avec la phase stationnaire dans un tube capillaire appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. L'échantillon à analyser est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers une colonne contenant une phase stationnaire. Les composés du mélange à analyser se séparent alors suivant leurs affinités avec la phase stationnaire. Un détecteur couplé à un ordinateur qui pilote l'ensemble du système chromatographique, est placé à la sortie de la colonne, ce détecteur conduit à l'obtention d'un tracé appelé chromatogramme constitué d'un ou plusieurs pics chromatographiques caractérisant chaque composé retenu.

Chaque composé possède un temps de rétention " t_r " spécifique qui le caractérise qualitativement, ce " t_r " est défini par le temps mis par ce composé pour traverser la colonne.

Annexe I : méthodes analytiques

De plus, l'aire des pics obtenus permet de mesurer la concentration de chaque composé du mélange injecté [32,34].

2 Appareillage

Dans tout appareil de chromatographie liquide à haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants (Figure 01) :

- Un système de pompage ;
- Un injecteur ;
- Une colonne chromatographique ;
- Un détecteur ;
- Un système d'acquisition de données ;

La phase mobile, délivrée à partir du réservoir, circule à travers la colonne, généralement à débit constant, puis passe à travers le détecteur [25].

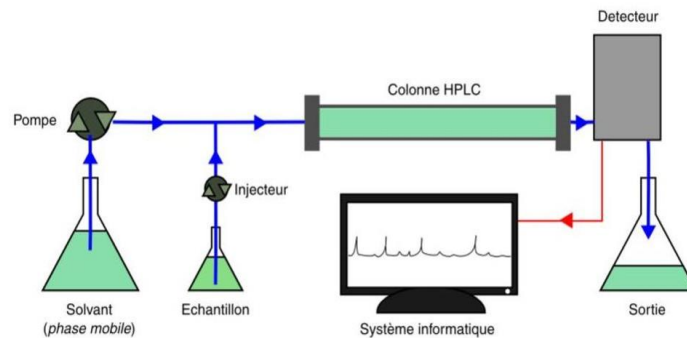


Schéma des différents composants d'un chromatographe pour HPLC [34].

2.1 Système de pompage

Il permet la délivrance en continu d'un volume de phase mobile par unité de temps. Il permet de travailler en mode isocratique, c'est-à-dire un seul solvant unique est délivré tout au long de l'analyse, ou en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange de solvants.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μL à plusieurs ml/min . Généralement pilotées par informatique [32].

- *Phase mobile :*

En fonction de la polarité de la phase stationnaire, on distingue deux situations :

Si on a une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire.

Si on a une phase stationnaire très peu polaire, on oppose alors une phase mobile polaire.

Annexe I : méthodes analytiques

La chromatographie est dite en phase normale dans le premier cas et en phase inversée dans le second [25].

2.2 Injecteur

La méthode la plus pratique d'introduire l'échantillon est le procédé d'injection par boucles d'échantillonnages, ces injecteurs en boucle permettent d'injecter avec précision toujours le même volume de liquide dans la chaîne d'HPLC. Il existe des boucles de différents volumes (10 à 100 μL), le choix du volume se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser [35,36].

La Vanne à boucle d'échantillonnage possède 6 voies (6 orifices) qui peuvent se régler sur deux positions :

- Position de remplissage de la boucle d'injection appelée « load »
- Position d'injection dans la colonne (mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique) appelée « inject »

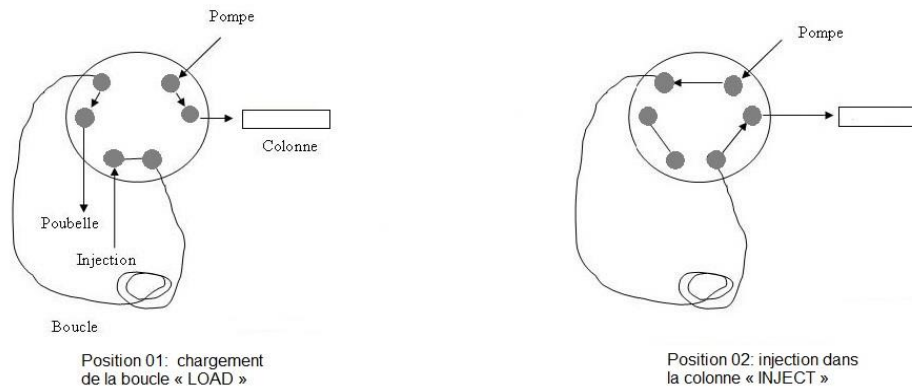


Schéma des deux positions de la boucle d'injection d'une HPLC [36].

2.3 Colonne chromatographique

Elle est généralement en acier inoxydable, elle se caractérise par un diamètre interne de 4 à 4.6 mm, une longueur qui varie de 5 à 30 cm. et par la nature de la phase stationnaire qu'elle contient.

Dans la plupart des analyses, la colonne est souvent précédée d'une précolonne dite colonne de garde remplie de la même phase stationnaire, cette dernière sert à retenir certaines impuretés, et ainsi on protège la colonne et on augmente sa durée de vie.

Un filtre est également placé en sortie de pompe pour éliminer toutes les particules solides qui pourraient obstruer la colonne [36].



Colonnes pour HPLC [37].

2.3.1 Efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne dépend du nombre de plateaux théoriques N et la hauteur équivalente à un plateau théorique H ou HEPT.

a. Nombre de plateaux théoriques N :

Le nombre de plateaux théorique N dépend de la nature du composé à analyser, de la colonne, de la température de la colonne, de la nature de la phase mobile et du temps de rétention. Il est calculé comme suit : [4]

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_H} \right)^2$$

Avec :

N : Nombre de plateaux théoriques.

t_R : Temps de rétention du pic correspondant au composant considéré.

w_h : Largeur du pic à mi-hauteur.

Plus le nombre de plateaux théorique N est élevé, plus l'efficacité de la colonne est importante et plus le pic du composé sera fin [39].

b. Hauteur Equivalente d'un Plateau Théorique H :

Elle est calculée par la formule suivante : [4]

$$H = \frac{L}{N}$$

Avec :

L : longueur de la colonne.

N : nombre de plateau théorique.

Plus la hauteur de plateau H est faible, plus la colonne est efficace [36].

Annexe I : méthodes analytiques

c. Résolution :

La résolution est définie comme étant l'aptitude d'une colonne à séparer deux analytes donnant des pics adjacents. Elle est calculée grâce à la formule suivante : [4]

$$R_s = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h1} + w_{h2})}$$

Avec : $t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1} , t_{R2} : temps de rétention des pics;

w_{h1} , w_{h2} : largeur des pics à mi-hauteur ;

Plus R_s est grand, meilleure est la séparation.[32]

2.3.2 La phase stationnaire

- **La phase normale:**

Elle est constituée de gel de silice qui est très polaire et qui nécessite donc l'utilisation d'un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations [32].

- **La phase inverse :**

Elle est généralement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 à 18 atomes de carbones (C8 et C18), ce matériau est apolaire, ce qui nécessite donc l'utilisation d'un éluant polaire. (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à la phase normale, la qualité de la séparation est maintenue constante [32].

2.4 Détecteur

Il s'agit d'un instrument placé à la sortie de la colonne. Il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés [38].

Un détecteur idéal est un détecteur qui présente les caractéristiques suivantes:[39]

- Une sensibilité appropriée, en générale les sensibilités des détecteurs utilisés de nos jours sont comprise entre 10^{-8} et 10^{-15} grammes de soluté.
- Une bonne stabilité et une bonne reproductibilité.
- Une réponse linéaire.
- Un temps de réponse rapide indépendant de la vitesse d'écoulement.

Annexe I : méthodes analytiques

- Une grande fiabilité et facilité d'emploi.
- Une réponse uniforme à tous les solutés ou, au contraire, réponse sélective limitée à une ou plusieurs classes de solutés.
- Un domaine de température de fonctionnement compris entre la température ambiante et au moins 400°C.
- La préservation de l'intégrité de l'échantillon (Non destructif).

Parmi les détecteurs les plus utilisés en HPLC on cite, les détecteurs d'absorption dans l'UV-visible dont les détecteurs UV à barrette de diodes. La détection peut également reposer sur la fluorimétrie, la réfractométrie différentielle, des méthodes électrochimiques, la spectrométrie de masse...etc [25].

2.5 Système d'acquisition de données (Enregistreur)

Il s'agit d'un ordinateur qui récupère les données issues du détecteur grâce à un logiciel approprié, il trace les chromatogrammes de chaque molécule éluée, et intègre la surface des pics [32].

II. Test de dissolution

L'essai de dissolution est un test pharmaco-technique destiné à déterminer la plus ou moins grande aptitude d'une forme galénique à laisser passer en solution, dans un milieu déterminé, le ou les principes actifs qu'elle contient. Le passage en solution est apprécié par le dosage du principe actif dans des échantillons prélevés du milieu de dissolution à intervalles de temps différents. In vitro, il permet de s'assurer, qu'une fois le comprimé est administré, il libèrera dans l'organisme le ou les PA qu'il contient et ceci dans les limites de concentration et de vitesse déterminées, afin de garantir l'effet thérapeutique recherché [23].

1. Appareillage

Compte tenu de la diversité des formes pharmaceutiques orales solides et des propriétés physico-chimiques des principes actifs, il n'est pas possible de concevoir un appareil unique utilisable pour toutes les formes. Les autorités d'enregistrement ont donc standardisé quatre appareils pour les pharmacopées (américaine, européenne et japonaise) pour les essais de dissolution des formes orales solides : [23]

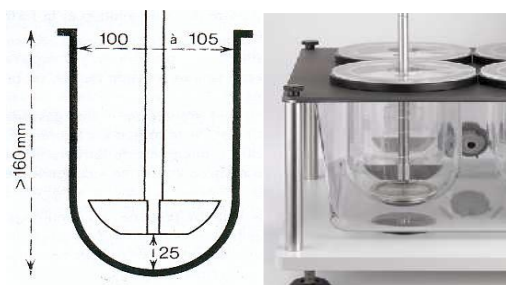
Annexe I : méthodes analytiques

- Appareil 1 : appareil à panier ;
- Appareil 2 : appareil à palettes ;
- Appareil 3 : appareil à piston ;
- Appareil 4 : cellule à flux continue ;

1) Appareil à palette

L'appareil à palette est constitué de :

- Un récipient cylindrique à fond hémisphérique, d'une capacité de 1000 millilitres, en verre borosilicaté ou en un autre matériau transparent, approprié, muni d'un couvercle et comportant un orifice central destiné au passage de la tige de l'agitateur ainsi que de plusieurs autres orifices permettant l'introduction d'un thermomètre et celle des dispositifs de prélèvement du liquide. les Cp à contrôler sont placés au fond du récipient ;
- Un agitateur : constitué d'une tige verticale à la partie inférieure de laquelle est fixée une palette, la tige est placée de façon que son axe ne s'écarte pas de plus de 2 mm de celui du récipient et que la partie inférieure de la palette soit située à une distance de 25 ± 2 mm du fond intérieur du récipient ; la partie supérieure de la tige de l'agitateur est reliée à un moteur muni d'un régulateur de vitesse ;
- Un bain d'eau thermostaté qui permet de maintenir la température du milieu de dissolution à $37 \pm 0,5$ °C pendant l'essai [43].



Appareil de dissolution à palette

2) Appareil à panier

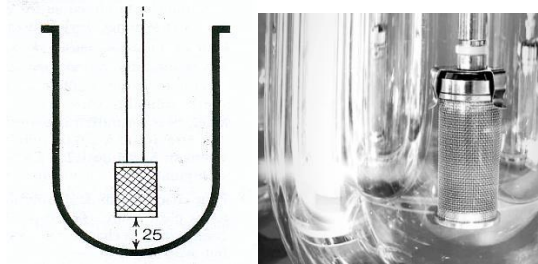
L'appareil à panier tournant est constitué de :

- Un récipient identique à celui décrit pour l'appareil à palette ;
- Un agitateur constitué par une tige verticale à la partie inférieure de laquelle est fixé un panier cylindrique ; le panier se compose de 2 parties ; la partie supérieure est une plaque percée d'un orifice de 2 mm soudée à la tige de l'agitateur ; la partie inférieure, cylindrique, est constituée par une toile soudée, cette partie est amovible et est destinée à

Annexe I : méthodes analytiques

recevoir l'échantillon à examiner. la distance entre le panier et le fond intérieur du récipient doit être de 25 ± 2 mm ; la partie supérieure de la tige de l'agitateur est reliée à un moteur muni d'un régulateur de vitesse.

- Un bain d'eau thermostaté qui permet de maintenir la température du milieu de dissolution à $37 \pm 0,5$ °C [4].



Appareil de dissolution à panier.

3) Appareil à piston

L'appareil à piston est constitué de :

- Un jeu de vases cylindriques en verre à fond plat de 250 mL ;
- De jeu de pistons tubulaires en verre munis de tamis aux extrémités pour que le comprimé ne sorte pas ;
- Un moteur et un système d'entraînement permettant d'imprimer aux pistons un mouvement vertical alternatif à l'intérieur des vases ;
- Un bain d'eau thermostaté à $37 \pm 0,5$ °C [4].

2. Choix de l'appareillage

Le choix de l'appareillage se fait en fonction de la forme galénique, de la solubilité du principe actif et du type de libération.

- L'appareil à panier est couramment utilisé pour les formes orales solides telles que les capsules et les comprimés.
- L'appareil à palette est aussi fréquemment employé pour les formes solides orales, avec en premier lieu les comprimés.
- L'appareil à piston est jugé particulièrement utile pour les formes galéniques à libération modifiée.
- La cellule à flux continu est plus particulièrement destinée à étudier les formes à libération modifiée et les formes multi particulaires, elle permet de simuler les différents

Annexe I : méthodes analytiques

milieux du tractus et le renouvellement permanent du solvant assure le respect des conditions *sink* pour les principes actifs très peu solubles.

- Pour les formes telles que les capsules qui flottent dans le milieu, un dispositif de lestage (fil d'acier inoxydable, fil de platine enroulé autour de la formulation) est utilisée pour maintenir la forme en place [23].

3. Choix du milieu de dissolution

Le choix du milieu de dissolution est généralement en fonction de la visée thérapeutique et /ou du mode d'absorption du principe actif (milieu gastrique ou intestinal). Il dépend bien évidemment de la solubilité du principe actif ; Si le principe actif est **soluble** en milieu aqueux, les milieux testés peuvent être de l'eau purifiée ou des milieux aqueux acide ou neutre (pH 1,2-4,5-6,8 le plus souvent). Comme il dépend également de la forme galénique du médicament :

- Pour une forme à libération immédiate : soit pH gastrique, soit pH 1,2 ou plus jusqu'à 5.
- Pour une forme à libération prolongée : soit pH 1,2 pendant 1h puis 6,8 jusqu'à la fin de l'essai, soit pH 6,8 directement [23].

4. Choix du volume de dissolution

Le volume du milieu de dissolution le plus couramment utilisé pour l'appareil à panier et à palette est de 900 mL. Le volume recommandé est compris entre 500 mL et 1000 mL [23].

5. Choix de la température du milieu

Pour les formes orales, la température doit être maintenue à $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ dans chaque vase avant le lancement du test (température corporelle) [23].

6. Choix de la vitesse de rotation

La vitesse de rotation est généralement comprise entre 50 et 100 rotations par minute (rpm) pour l'appareil à palette et à panier.

Pour l'appareil à flux continu, le débit est normalement ajusté à une valeur comprise entre 4 mL/min et 50 mL/min [23].

7. Choix de la méthode de dosage

Quand les formulations sont susceptibles de changer au cours du développement du produit, il est recommandé d'utiliser la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) comme méthode de dosage.

Annexe I : méthodes analytiques

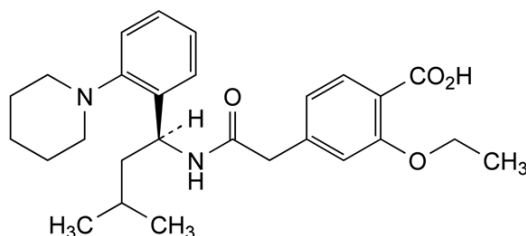
Cependant, les méthodes de dosage spectrophotométrique UV sont plus souhaitables pour un contrôle de routine de la qualité en raison de la facilité et la rapidité de l'analyse [23].

Annexe II : monographies du répaglinide

I. Répaglinide (Pharmacopée Européenne)

RÉPAGLINIDE

Repaglinidum



$C_{27}H_{36}N_2O_4$

M_r 452,

[135062-02-1]

DÉFINITION

Acide 2-éthoxy-4-[2-[[*(1S)*]-3-méthyl-1-[2-(pipéridin-1-yl)phényl]butyl]amino]-2-oxoéthyl]benzoïque.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

CARACTÈRES

Aspect : poudre blanche ou sensiblement blanche.

Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol et dans le chlorure de méthylène.

Le repaglinide présente le phénomène du polymorphisme (5.9).

IDENTIFICATION

A. Pouvoir rotatoire spécifique (2.2.7): + 6,3 à + 7,7.

Dissolvez 1,00 g de repaglinide dans du méthanol R et complétez à 20,0 mL avec le même solvant.

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

Comparaison : repaglinide SCR.

Si les spectres obtenus à l'état solide présentent des différences, dissolvez séparément la substance à examiner et la substance de référence dans de l'éthanol anhydre R, évaporez à siccité et enregistrez de nouveaux spectres à partir des résidus.

Annexe II : monographies du repaglinide

ESSAI

Pureté énantiomérique. Chromatographie liquide (2.2.29).

Préparez les solutions dans des récipients de verre ambré.

Solution à examiner. Dissolvez 10.0 mg de repaglinide dans du méthanol R et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

Solution témoin (a). Dissolvez 5.0 mg d'impureté E de *repaglinide SCR* dans du méthanol R et complétez à 50.0 mL avec le même solvant.

Solution témoin (b). Prélevez 2.0 mL de solution témoin (a) et complétez à 100.0 mL avec du méthanol R.

Solution témoin (c). Mélangez 1.0 mL de solution à examiner et 10 mL de solution témoin (a), puis complétez à 50.0 mL avec du méthanol R.

Colonne :

- dimensions : l = 0,1 m, Ø = 4,0 mm,
- phase stationnaire : gel de silice AGP pour séparation des composés chiraux R (5 µm).

Phase mobile:

- phase mobile A : solution de phosphate monopotassique R à 1,0 g/L ajustée à pH 4,7 avec de la solution diluée d'hydroxyde de sodium R ;
- phase mobile B : acétonitrile R ;

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent V/V)	Phase mobile B (pour cent V/V)
0 - 4	80 → 60	20 → 40
4 - 6	60	40

Equilibrage après installation de la colonne pour emploi : avec de l'eau R, en portant lentement le débit de 0,2 mL/min à 0,5 mL/min, puis en le maintenant à 0,5 mL/min pendant 5 min.

Avant la première analyse, la colonne doit être lavée à un débit de 1 mL/min avec de l'eau R pendant 1 h et avec la phase mobile à la composition initiale pendant 1h.

Débit : 1,0 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 240 nm.

Injection : 10 µL de solution à examiner et des solutions témoins (b) et (c).

Temps de rétention : repaglinide = environ 3,3 min ; impureté E = environ 5,0 min.

Annexe II : monographies du repaglinide

Conformité du système : solution témoin (c) :

- résolution : au minimum 1,5 entre les pics dus au répaglinide et à l'impureté E.

Limite :

- impureté E : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,2 pour cent).

Substances apparentées. Chromatographie liquide (2.2.29).

Solution à examiner. Dissolvez 30,0 mg de répaglinide dans de l'acétonitrile R et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

Solution témoin (a). Prélevez 5,0 mL de solution à examiner et complétez à 100,0 mL avec de l'acétonitrile R. Prélevez 2,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'acétonitrile R.

Solution témoin (b). En utilisant un bain à ultrasons, dissolvez le contenu d'un flacon de répaglinide pour conformité du système SCR dans 2,0 mL d'acétonitrile R.

Colonne :

- dimensions : $l = 0,15$ m, $\varnothing = 4,6$ mm,
- phase stationnaire : gel de silice alkylé pour chromatographie à utiliser avec des phases mobiles fortement aqueuses R (5 μ m),
- température : 45 °C.

Phase mobile :

- phase mobile A : solution de phosphate monopotassique R à 4,0 g/L ajustée à pH 3,2 avec de l'acide phosphorique dilué R ;
- phase mobile B : phase mobile A, acétonitrile R (300:700 V/V) ;

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent V/V)	Phase mobile B (pour cent V/V)
0 – 20	50 → 7	50 → 93
20 - 30	7	93

Débit : 1,5 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 240 nm.

Annexe II : monographies du repaglinide

Injection : 10 μ L.

Rétention relative par rapport au répaglinide (temps de rétention = environ 10 min) : impureté A = environ 0,2 ; impureté B = environ 0,3 ; impureté C = environ 0,4 ; impureté D = environ 1,5.

Conformité du système : solution témoin (b) :

- résolution : au minimum 5,0 entre les pics dus à l'impureté B et à l'impureté C,
- le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme fourni avec le répaglinide pour conformité du système SCR.

Limites :

- facteurs de correction : pour le calcul des teneurs, multipliez la surface du pic des impuretés suivantes par le facteur de correction correspondant : impureté A = 0,6 ; impureté B = 0,7 ; impureté C = 3,1 ;
- impuretés A, B, C, D : pour chaque impureté, au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,1 pour cent) ;
- toute autre impureté : pour chaque impureté, au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,1 pour cent) ;
- total : au maximum 5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,5 pour cent) ;
- limite d'exclusion : 0,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,05 pour cent).

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de répaglinide.

Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de répaglinide.

DOSAGE

Dissolvez 0,320 g de répaglinide dans 10 mL de méthanol R et ajoutez 60 mL d'acide acétique anhydre R. Titrez par l'acide perchlorique 0,1 M. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20).

1 mL d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 45,26 mg de $C_{27}H_{36}N_2O_4$.

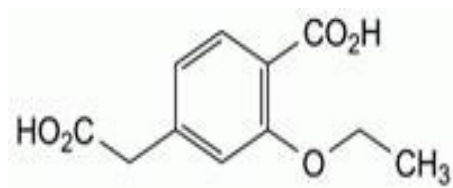
Annexe II : monographies du repaglinide

CONSERVATION

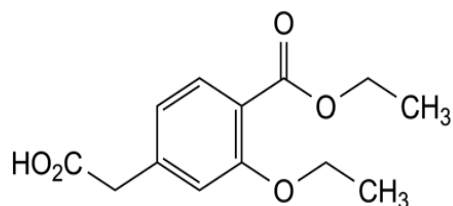
A l'abri de la lumière.

IMPURETÉS

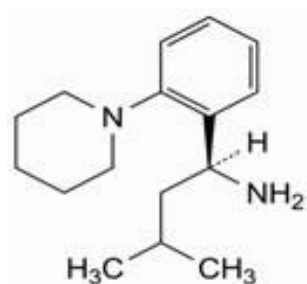
Impuretés spécifiées : A, B, C, D, E.



A. acide 4-(carboxyméthyl)-2-éthoxybenzoïque,

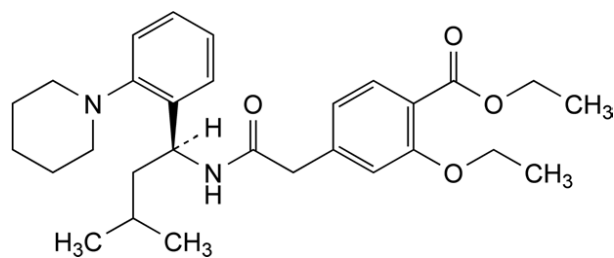


B. acide [3-éthoxy-4-(éthoxycarbonyl)phényl]acétique,

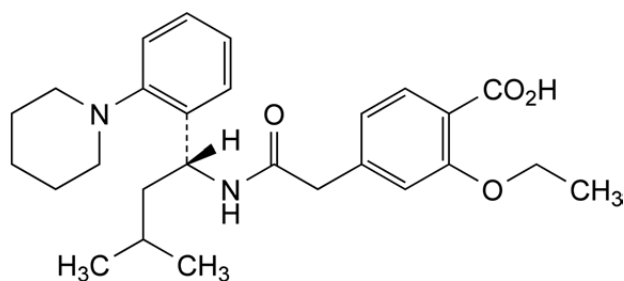


C. (1S)-3-méthyl-1-[2-(pipéridin-1-yl)phényl]butan-1-amine,

Annexe II : monographies du repaglinide



D. 2-éthoxy-4-[2-[[*(1S)*-3-méthyl-1-[2-(pipéridin-1-yl)-phényl]butyl]amino]-2-oxoéthyl]benzoate d'éthyle,



E. acide 2-éthoxy-4-[2-[[*(1R)*-3-méthyl-1-[2-(pipéridin-1 yl) phényl]butyl]amino]-2-oxoéthyl]benzoïque.

Annexe II : monographies du repaglinide

II. Repaglinide tablets (pharmacopée Américaine)

DEFINITION

Repaglinide Tablets contain NLT 95.0% and NMT 105.0% of the labeled amount of Repaglinide ($C_{27}H_{36}N_2O_4$).

IDENTIFICATION

A. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION TEST <201>

Sample solution : To a quantity of powdered Tablets, equivalent to 10 mg of repaglinide, add 10 mL of a mixture of methanol and methylene chloride (1:1), shake for 15 min, and centrifuge.

Developing solvent system: Toluene, methylene chloride, and methanol (2:2:1)

Acceptance criteria: Meet the requirements

B. The retention time of the major peak of the Sample solution corresponds to that of the Standard solution, as obtained in the Assay.

C. The UV spectrum of the major peak of the Sample solution corresponds to that of the Standard solution, as obtained in the Assay.

ASSAY

• PROCEDURE

Buffer pH 4.0 : 2 g/L of monobasic ammonium phosphate solution. Adjust with phosphoric acid to a pH of 4.0.

Buffer pH 2.5 : 2 g/L of monobasic ammonium phosphate solution. Adjust with phosphoric acid to a pH of 2.5.

Mobile phase: Methanol and Buffer pH 2.5 (7:3)

Diluent: Methanol and Buffer pH 4.0 (7:3)

Standard solution 1: 800 µg/mL of USP Repaglinide RS in methanol

Standard solution 2: 80 µg/mL of USP Repaglinide RS, prepared by diluting 5.0 mL of Standard solution 1 with Diluent to 50.0 mL

System suitability stock solution: 80 µg/mL of USP Repaglinide Related Compound A RS in methanol

System suitability solution: 80 µg/mL of USP

Repaglinide RS and 1.6 µg/mL of USP Repaglinide Related Compound A RS prepared as follows. Transfer 1.0 mL of System suitability stock solution to a 50-mL volumetric flask, add 5.0 mL of Standard solution 1, and dilute with Diluent to volume.

Annexe II : monographies du repaglinide

Sample solution: Transfer 8 whole Tablets to a suitable volumetric flask, and dissolve in and dilute with Diluent to volume to obtain a solution containing 80 µg/mL. Stir for 20 min, and filter or centrifuge a portion of the solution.

Chromatographic system

(See Chromatography <621>, System Suitability.)

Mode: LC

Detector: UV 245 nm or diode array. [NOTE—Use diode array detector to perform Identification test C.]

Column: 4.0-mm × 6-cm; 5-µm packing L1

Column temperature: 40°

Flow rate: 1 mL/min

Injection volume: 20 µL

System suitability

Samples: Standard solution 2 and System suitability solution

[NOTE—The typical relative retention times for repaglinide related compound A and repaglinide are about 0.4 and 1.0, respectively.]

Suitability requirements

Resolution: NLT 7.0 between repaglinide related compound A and repaglinide, System suitability solution

Tailing factor: 0.8–2.0 for the repaglinide peak, System suitability solution

Relative standard deviation: NMT 2.0% for replicate injections, Standard solution 2

Analysis

Samples: Standard solution 2 and Sample solution

Calculate the percentage of the labeled amount of repaglinide (C₂₇H₃₆N₂O₄) in the portion of Tablets taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U = peak response from the Sample solution

r_S = peak response from Standard solution 2

C_S = concentration of USP Repaglinide RS in Standard solution 2 (µg/mL)

C_U = nominal concentration of repaglinide in the Sample solution (µg/mL)

Acceptance criteria: 95.0%–105.0%

Annexe II : monographies du repaglinide

PERFORMANCE TESTS

• DISSOLUTION <711>

Medium: pH 5.0 buffer, prepared by mixing 10.2 g of citric acid monohydrate and 18.16 g of dibasic sodium phosphate dihydrate with 1 L of water ; 900 mL

Apparatus 2: 75 rpm

Time: 30 min

Buffer: 1.5 g/L of monobasic potassium phosphate in water, adjusted with phosphoric acid to a pH of 2.3

Mobile phase: Acetonitrile, Buffer, and methanol(49:40:11)

Standard stock solution: 44 µg/mL of USP Repaglinide RS in methanol

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable filter.

Standard solution: Transfer 5.0 mL of the Standard stock solution to a 100 mL volumetric flask, add 25 mL of methanol, and dilute with Medium to volume. Further dilute with Medium, if needed, to a concentration that is similar to that of the Sample solution.

Chromatographic system

(See Chromatography <621>, System Suitability.)

Mode: LC

Detector: Fluorometric detector ; excitation wavelength of 244 nm and emission wavelength of 348 nm

Column: 4.0-mm × 12.5-cm; 10-µm packing L1

Column temperature: 40°

Flow rate: 1 mL/min

Injection volume: 20 µL

System suitability

Sample: Standard solution

Suitability requirements

Tailing factor: Between 0.5 and 2.0

Relative standard deviation: NMT 2.0%

Analysis

Samples: Sample solution and Standard solution

Calculate the percentage of the labeled amount of repaglinide (C₂₇H₃₆N₂O₄) dissolved:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/L) \times V \times 100$$

r_U = peak response from the Sample solution

Annexe II : monographies du repaglinide

r_S = peak response from the Standard solution

C_S = concentration of USP Repaglinide RS in the Standard solution (mg/mL)

L = label claim of repaglinide (mg/Tablet)

V = volume of Medium, 900 mL

Tolerances : NLT 70% (Q) of the labeled amount of repaglinide ($C_{27}H_{36}N_2O_4$) is dissolved.

• **UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS <905>** : Meet the requirements

Impurities

• **Organic impurities**

Buffer pH 4.0, Buffer pH 2.5, Mobile phase, Diluent, Standard solution 1, Standard solution 2, System suitability stock solution, System suitability solution, and Sample solution: Prepare as directed in the Assay.

Standard solution 3 : 0.2 $\mu\text{g/mL}$ of USP Repaglinide RS, prepared by diluting 2.5 mL of Standard solution 2 with Diluent to 1000 mL

Chromatographic system:

Mode: LC

Detector: UV 210 nm

Column: 4.0-mm \times 6-cm; 5- μm packing L1

Column temperature: 40°

Flow rate: 1 mL/min

Injection volume: 20 μL

System suitability

Samples: System suitability solution and Standard solution 3

[NOTE—The typical relative retention times for repaglinide related compound A and repaglinide are about 0.4 and 1.0, respectively.]

Suitability requirements

Resolution: NLT 7.0 between repaglinide related compound A and repaglinide, System suitability solution

Tailing factor: 0.8–2.0 for the repaglinide peak, System suitability solution

Relative standard deviation: NMT 10% for replicate injections, Standard solution 3

Annexe II : monographies du repaglinide

Analysis

Samples: Sample solution and Standard solution 3

Calculate the percentage of each impurity in the portion of Tablets taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U = peak response of each impurity from the Sample solution

r_S = peak response of repaglinide from Standard solution 3

C_S = concentration of USP Repaglinide RS in Standard solution 3 ($\mu\text{g/mL}$)

C_U = nominal concentration of repaglinide in the Sample solution ($\mu\text{g/mL}$)

Acceptance criteria: NMT 0.5% of total impurities

ADDITIONAL REQUIREMENTS

• **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in tight containers.

• **USP REFERENCE STANDARDS** <11>

USP Repaglinide RS

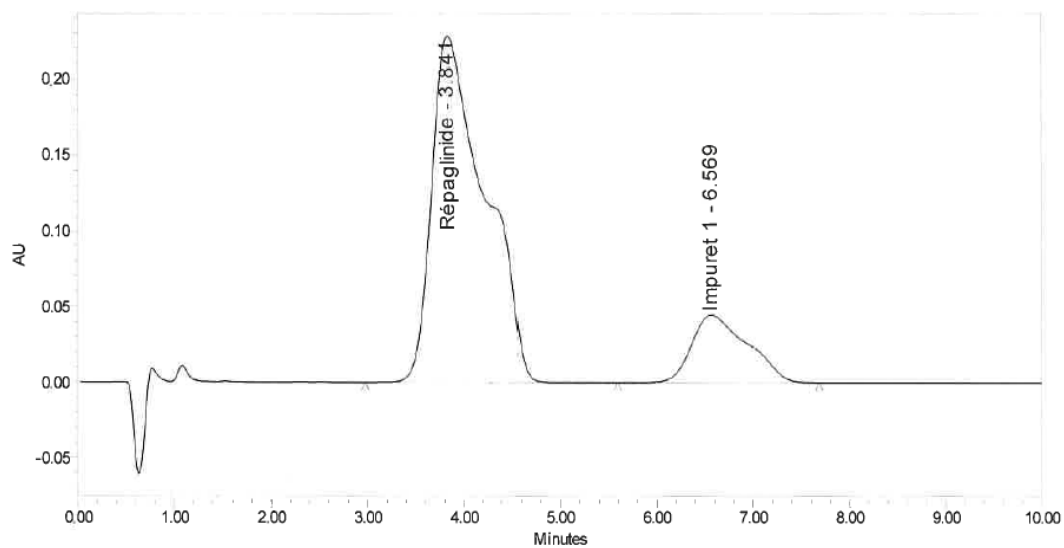
USP Repaglinide Related Compound A RS

(S)-3-Methyl-1-[2-(1-piperidinyl)phenyl] butylamine, N-acetyl-L-glutamate salt.

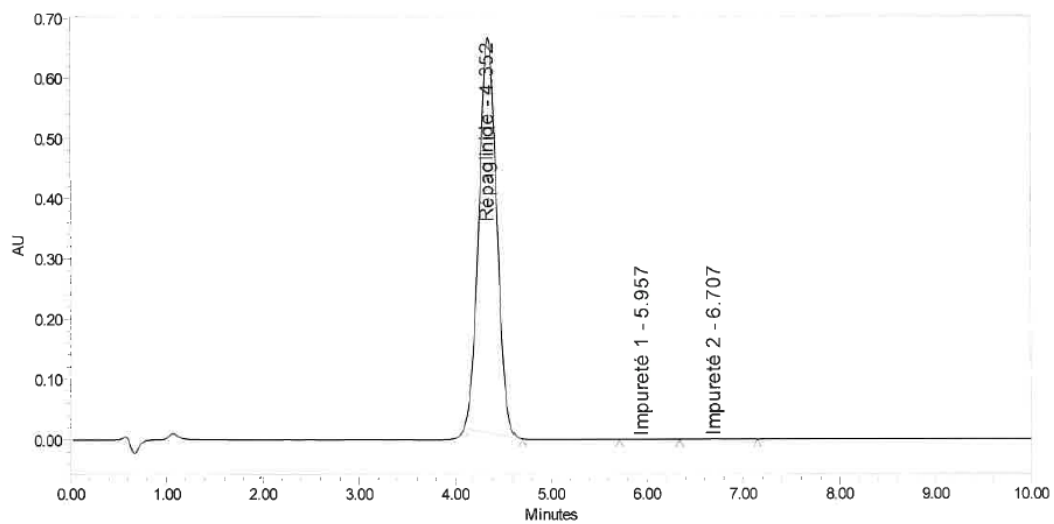
$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2 \cdot \text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_5$ 435.6

Annexe III :
chromatogrammes de l'étude
de la dégradation forcée du
répaglinide

Annexe III : chromatogrammes de l'étude de la dégradation forcée du répaglinide

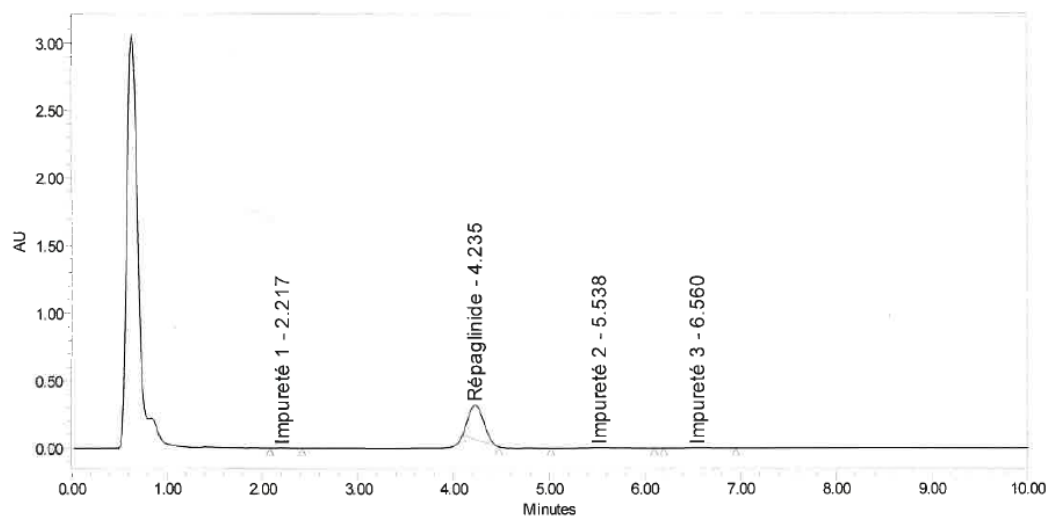


Chromatogramme non zoomé de la solution du répaglinide dégradée par l'acide chlorhydrique à 0.5N.

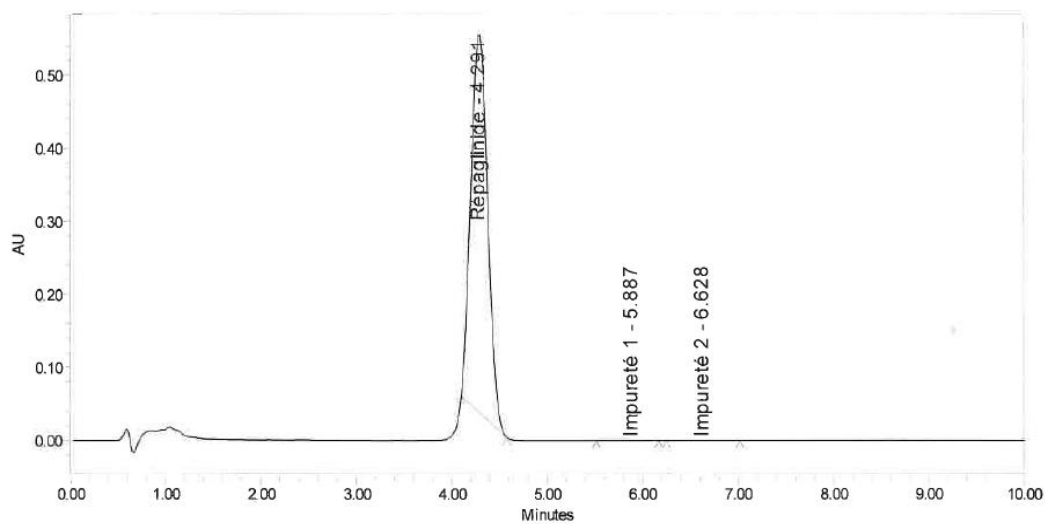


Chromatogramme non zoomé de la solution du répaglinide porté à reflux.

Annexe III : chromatogrammes de l'étude de la dégradation forcée du répaglinide

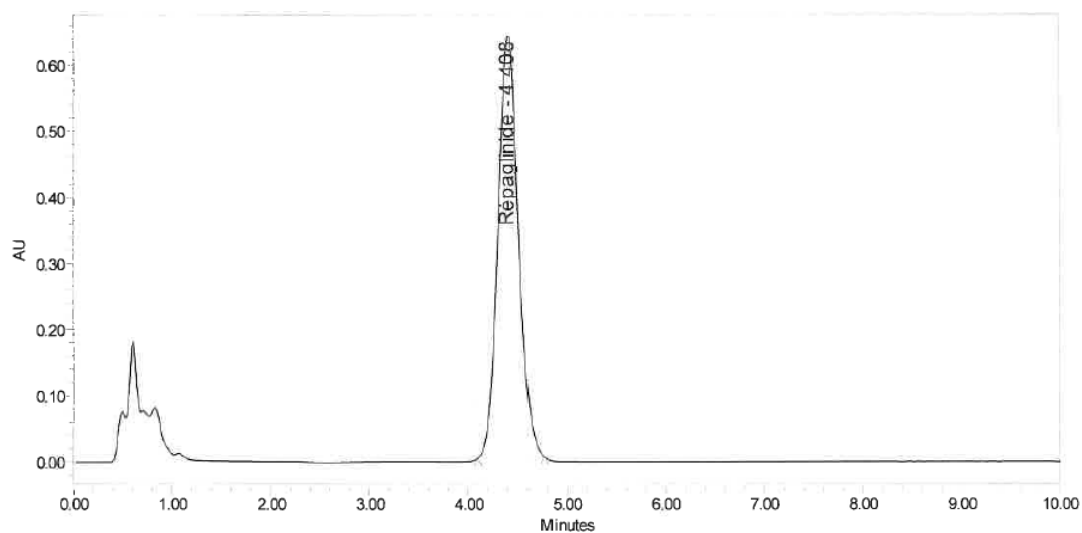


Chromatogramme non zoomé de la solution du répaglinide dégradée par le peroxyde d'hydrogène à 30%.

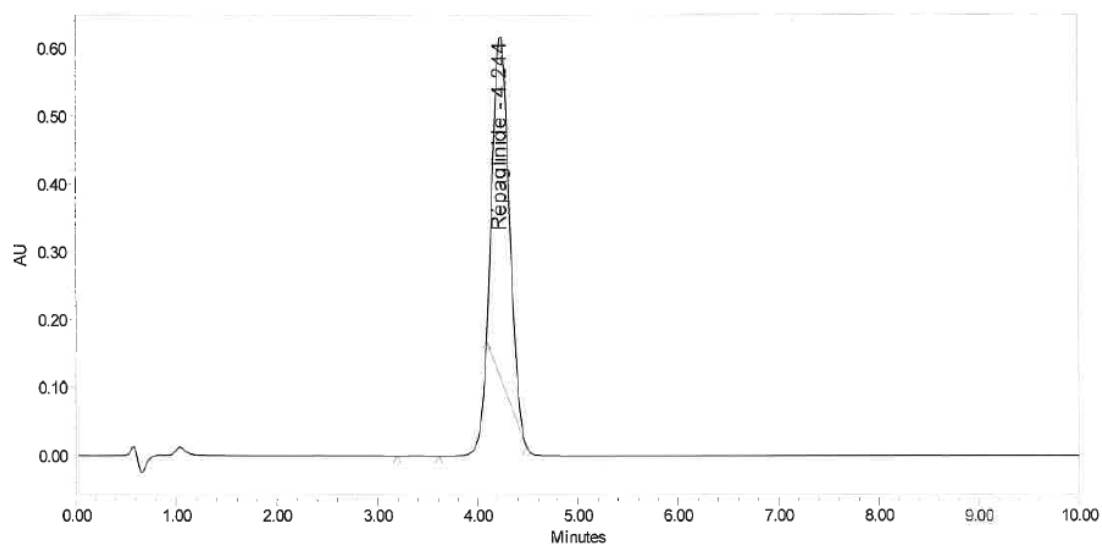


Chromatogramme non zoomé de la solution du répaglinide dégradée par une lumière UV.

Annexe III : chromatogrammes de l'étude de la dégradation forcée du répaglinide



Chromatogramme non zoomé de la solution du répaglinide dégradée par une base.



Chromatogramme non zoomé de la solution du répaglinide dégradée par la chaleur.

Résumé

L'objectif de ce présent travail est d'étudier la stabilité d'un principe actif « *Répaglinide* » dans des conditions de dégradation forcée à savoir : la dégradation hydrolytique dans un milieu acide, basique et neutre, la dégradation oxydative, thermique et photolytique. De plus, une étude de stabilité de son produit fini « *Novonorm 0,5 mg, Cp non enrobé* » dans des conditions accélérées a été réalisée. Différents tests physicochimiques, microbiologiques et biopharmaceutiques ont été effectués à savoir : l'aspect, la dureté, la perte à la dessiccation, l'identification et le dosage du principe actif par HPLC, dosages des impuretés par HPLC, la dissolution et la pureté microbienne (DGAT, DLMT, recherche de *E. coli*). Les résultats ont montré que le « *Répaglinide* » est sensible à la lumière, à l'air et à l'hydrolyse en milieu acide et neutre. Par contre, demeure stable dans les conditions thermiques et basiques. Les résultats des tests physico-chimiques, microbiologiques et biopharmaceutiques effectués sur le produit fini « *Novonorm 0,5mg* » ont montré que ce dernier restera stable durant toute sa durée de validité.

Mots clés : HPLC, répaglinide, Novonorm, stabilité accélérée, contrôle physicochimique, dégradation forcée.

Abstract

The aim of this work is the study of the stability of an active ingredient « *Repaglinide* » under forced degradation conditions namely: the hydrolytic degradation in acidic, basic and neutral medium, oxidative, thermal and photolytic degradation. In addition, a stability study of its finished product « *Novonorm 0.5 mg, uncoated tablets* » under accelerated conditions is carried out. Different physicochemical, microbiological and biopharmaceutical tests Viz. the appearance, the hardness, the drying loss, the identification and the determination of the active ingredient using HPLC, determination of impurities by HPLC, dissolution and microbial purity (DGAT, DLMT, search for *E. coli*). The results showed that « *Repaglinide* » is sensitive to light, air and hydrolysis in acidic and neutral medium. However, remains stable under thermal and basic conditions. The results of the physicochemical, microbiological and biopharmaceutical tests on the finished product « *Novonorm 0.5mg* » remains stable throughout its validity period.

Keywords : HPLC, repaglinide, Novo norm, accelerated stability, physicochemical control, forced degradation.