Université Tunis El Manar



Faculté des Sciences de Tunis

Département de Chimie

**Mémoire de Projet de Fin d’Études**

*Présenté pour l’obtention du*

**Diplôme d’Ingénieur en Chimie Analytique et Instrumentation**

*Réalisé par*

**Haddoudi Thana**

***Optimisation et validation d’une méthode de dosage simultané de deux principes actifs par HPLC***

Soutenu le 14 Juillet 2016 devant le jury d’examen composé de :

M. **Ben Romdhan Hatem**  Professeur, FST Président

M. **Ben Hamida Najib**  Professeur, FST Examinateur

M. **El Efrit Mohamed Lotfi**  Professeur, FST Encadrant Universitaire

M. **Habibi Belhssan**  Chef Laboratoire, Encadra Industriel SIPHAT

Année Universitaire 2015-2016

Dédicace

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,*

***À MES CHERS PARENTS,*** *que ce travail soit l’expression de ma reconnaissance pour vos sacrifices consentis, votre soutien moral et matériel que vous n’avez cessé de prodiguer. Vous avez tout fait pour mon bonheur et ma réussite. Que dieu vous préserve en bonne santé et vous accorde une longue vie.*

***À Ma Chère SŒUR****, vous étiez toujours présents pour m’aider et m’encourager. Sachiez que vous serez toujours dans mon cœur.*

Remercîment

Dans le cadre de l’élaboration de mon projet de fin d’études pour l’obtention du diplôme national d’ingénieur en Chimie Analytique et Instrumentation au sein de la Société des Industries Pharmaceutiques de Tunisie « SIPHAT », nous voulons exprimer par ces quelques lignes de remercîments notre gratitude envers tous ceux en qui par leur présence, leur soutien, leur disponibilité et leurs conseils, nous avons le courage d’accomplir ce projet.

Nous commençons par remercier notre encadrant industriel, **Mr. Habibi Belhassen,** qui nous a fait l’honneur d’être notre encadrant. Nous le remercions profondément pour son encouragement continue et aussi d’être toujours là pour nous écouter, nous aider et nous guider à retrouver le bon chemin par sa sagesse et ses précieux conseils. Ainsi que son soutien moral et sa preuve de compréhension, ce qui nous adonne la force et le courage d’accomplir ce projet.

Je porte un remercîment particulier à **Mr. Ben Ameur Melik**, Technicien Supérieur au sein du laboratoire de Contrôle Qualité qui m’a soutenu tout au long de ce projet. Je tiens à lui exprimer ma grande admiration pour sa qualité humaine et son soutien moral.

Je suis particulièrement reconnaissante à mon encadrant **Mr. El Efrit Mohamed Lotfi**, professeur universitaire à la faculté des sciences de Tunis pour l’aide scientifique précieuse, pour son écoute active et pour tous les moyens qu’il a su mettre à ma disposition pour mener à bien ce travail.

Je tiens également à remercier et exprimer mon profond respect aux membres de jury d’avoir accepté de juger ce travail.

Sommaire

[Introduction générale 1](#_Toc454744883)

[Avant-propos 2](#_Toc454744884)

[Présentation de l’entreprise 3](#_Toc454744885)

[1. Généralité sur l’entreprise 3](#_Toc454744886)

[2. Activité 3](#_Toc454744887)

[3. Équipements de production 4](#_Toc454744888)

[4. La gamme de spécialités pharmaceutique produites par la SIPHAT 4](#_Toc454744889)

[5. Structure de la société 5](#_Toc454744890)

[Chapitre I : Étude bibliographique 6](#_Toc454744891)

[Introduction 7](#_Toc454744893)

[I.1. Généralités sur le médicament 7](#_Toc454744894)

[I.1.1. Définition d'un médicament 7](#_Toc454744895)

[I.1.2. La composition d'un médicament 7](#_Toc454744896)

[I.1.2.1. Principe actif 7](#_Toc454744897)

[I.1.2.2. Les excipients 7](#_Toc454744898)

[I.1.3. Médicaments princeps 8](#_Toc454744899)

[I.1.4. Médicaments génériques 8](#_Toc454744900)

[I.1.5. Présentation du médicament étudié : « Bi-spirogyl » 8](#_Toc454744901)

[I.1.5.1. Généralités 8](#_Toc454744902)

[I.1.5.2. Indications 9](#_Toc454744903)

[I.1.5.3. Mode d'administration et posologie 9](#_Toc454744904)

[I.1.5.4. Les effets indésirables 10](#_Toc454744905)

[I.1.5.5. Présentation des principes actifs de « Bi-spirogyl » 10](#_Toc454744906)

[I.1.5.5.1. Spiramycine 10](#_Toc454744907)

[I.1.5.5.2. Métronidazole 12](#_Toc454744908)

[I.2. La chromatographie 13](#_Toc454744909)

[I.2.1. Historique 13](#_Toc454744910)

[I.2.2. Intérêt de la chromatographie 13](#_Toc454744911)

[I.2.3. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) 14](#_Toc454744912)

[I.2.3.1. Généralité 14](#_Toc454744913)

[I.2.3.2. Principe 14](#_Toc454744914)

[I.2.3.3. Appareillage 14](#_Toc454744915)

[I.2.3.3.1. Réservoir de la phase mobile 15](#_Toc454744916)

[I.2.3.3.2. Le système de pompage 15](#_Toc454744917)

[I.2.3.3.3. L'injecteur 16](#_Toc454744918)

[I.2.3.3.4. La colonne 16](#_Toc454744919)

[I.2.3.3.5. Le détecteur 17](#_Toc454744920)

[I.2.3.3.6. L’enregistreur 18](#_Toc454744921)

[I.2.4. Grandeurs chromatographiques 18](#_Toc454744922)

[I.2.4.1. Temps de rétention (tR) 18](#_Toc454744923)

[I.2.4.2. Coefficient de distribution (K) 19](#_Toc454744924)

[I.2.4.3. Facteur de capacité (k’) 20](#_Toc454744925)

[I.2.4.4. Facteur de sélectivité (α) 20](#_Toc454744926)

[I.2.4.5. Nombre de plateaux théoriques (N) 20](#_Toc454744927)

[I.2.4.6. Résolution (Rs) 21](#_Toc454744928)

[I.3. Paramètres influençant l’optimisation d’une méthode de dosage 21](#_Toc454744929)

[I.3.1. La colonne chromatographique 21](#_Toc454744930)

[I.3.2. La phase mobile 22](#_Toc454744931)

[I.3.3. Le pH de la phase mobile 22](#_Toc454744932)

[I.3.4. La température 22](#_Toc454744933)

[I.4. Validation d’une méthode analytique 23](#_Toc454744934)

[I.4.1. Définition 23](#_Toc454744935)

[I.4.2. Objectif de la validation 23](#_Toc454744936)

[I.4.3. Les critères de validation analytique 23](#_Toc454744937)

[I.4.3.1. La Spécificité 23](#_Toc454744938)

[I.4.3.2. La Linéarité 23](#_Toc454744939)

[I.4.3.3. La Fidélité 23](#_Toc454744940)

[I.4.3.3.1. La répétabilité 24](#_Toc454744941)

[I.4.3.3.2. La fidélité intermédiaire 24](#_Toc454744942)

[I.4.3.4. L’exactitude 24](#_Toc454744943)

[I.4.3.5. La Limite de détection (LD) 24](#_Toc454744944)

[I.4.3.6. La Limite de quantification (LQ) 24](#_Toc454744945)

[I.5. Études de stabilité des médicaments 24](#_Toc454744946)

[I.5.1. Définition 25](#_Toc454744947)

[I.5.2. Objectifs des études de stabilité 25](#_Toc454744948)

[I.5.3. Types d’étude de stabilité 25](#_Toc454744949)

[I.5.3.1. Les études de dégradation accélérée 25](#_Toc454744950)

[I.5.3.2. Les études de stabilité en temps réel 25](#_Toc454744951)

[I.5.4. Durée et conditions de stockage et de conservation des médicaments 26](#_Toc454744952)

[I.5.5. Les tests pharmaco-techniques 26](#_Toc454744953)

[I.5.5.1. Contrôle de l’aspect du produit fini 27](#_Toc454744954)

[I.5.5.2. Contrôle de la masse moyenne 27](#_Toc454744955)

[I.5.5.3. Test de désagrégation 27](#_Toc454744956)

[I.5.5.4. Dosage 27](#_Toc454744957)

[Conclusion 27](#_Toc454744958)

[Chapitre II : Matériels et méthodes 28](#_Toc454744959)

[Introduction 29](#_Toc454744961)

[II.1. Réactifs et échantillons de matières premières utilisés 29](#_Toc454744962)

[II.2. Appareillage 30](#_Toc454744963)

[II.3. Optimisation de la méthode de dosage 30](#_Toc454744964)

[II.4. Validation analytique de la méthode de dosage des principes actifs de Bi-spirogyl 31](#_Toc454744965)

[II.4.1. Préparation des solutions 31](#_Toc454744966)

[II.4.1.1. Préparation de la solution tampon 31](#_Toc454744967)

[II.4.1.2. Préparation de la phase mobile 31](#_Toc454744968)

[II.4.1.3. Préparation de diluant 32](#_Toc454744969)

[II.4.1.4. Préparation du témoin 32](#_Toc454744970)

[II.4.1.5. Préparation d’essai 32](#_Toc454744971)

[II.4.1.6. Préparation du placébo 32](#_Toc454744972)

[II.4.1.7. Préparation de la FPR 33](#_Toc454744973)

[II.4.2. Étude de la spécificité 33](#_Toc454744974)

[II.4.3. Étude de la linéarité 33](#_Toc454744975)

[II.4.3.1. Linéarité des principes actifs seuls 33](#_Toc454744976)

[II.4.3.2. Linéarité de la FPR 34](#_Toc454744977)

[II.4.4. Étude de la fidélité 34](#_Toc454744978)

[II.4.4.1. La répétabilité 34](#_Toc454744979)

[II.4.4.2. La fidélité intermédiaire 35](#_Toc454744980)

[II.4.5. Étude de l'exactitude 35](#_Toc454744981)

[II.4.6. Limite de détection (LD) et de quantification (LQ) 35](#_Toc454744982)

[II.4.7. Étude statistique des données 36](#_Toc454744983)

[II.4.7.1. Linéarité 36](#_Toc454744984)

[II.4.7.1.1. Test d’homogénéité des variances : Test de Cochran 36](#_Toc454744985)

[II.4.7.1.2. Tests de Student 37](#_Toc454744986)

[II.4.7.1.3. Test de Fisher : Test de l'existence d'une pente significative 39](#_Toc454744987)

[II.4.7.2. Fidélité 39](#_Toc454744988)

[II.4.7.2.1. Test d’homogénéité des variances : Test de Cochran 39](#_Toc454744989)

[II.4.7.2.2. Évaluation de la fidélité 40](#_Toc454744990)

[II.4.7.3. L’exactitude 40](#_Toc454744991)

[II.4.7.3.1. Calcul des recouvrements 40](#_Toc454744992)

[II.4.7.3.2. Test d’homogénéité des variances : Test de Cochran 40](#_Toc454744993)

[II.4.7.3.3. Test de validité des moyennes 40](#_Toc454744994)

[II.4.7.3.4. Estimation de recouvrement moyen 41](#_Toc454744995)

[II.5. Application : Dosage du médicament étudié : « Bi-spirogyl » 42](#_Toc454744996)

[II.6. Étude de la stabilité du médicament étudié : « Bi-spirogyl » 42](#_Toc454744997)

[II.6.1. Contrôle d’aspect du produit fini 43](#_Toc454744998)

[II.6.2. Masse moyenne 43](#_Toc454744999)

[II.6.3. Essai de désagrégation 43](#_Toc454745000)

[II.6.4. Dosage 43](#_Toc454745001)

[Conclusion 43](#_Toc454745002)

[Chapitre III : Résultats et discussion 44](#_Toc454745003)

[Introduction 45](#_Toc454745005)

[III.1. Optimisation de la méthode de dosage 45](#_Toc454745006)

[III.1.1. Choix de la longueur d’onde de détection 45](#_Toc454745007)

[III.1.2. Choix de la phase mobile 46](#_Toc454745008)

[III.1.3. Choix du pH de la phase mobile 46](#_Toc454745009)

[III.2. Validation analytique de la méthode de dosage des principes actifs de Bi-spirogyl 47](#_Toc454745010)

[III.2.1. Spécificité 47](#_Toc454745011)

[III.2.2. Limite de détection et de quantification 47](#_Toc454745012)

[III.2.3. Linéarité 49](#_Toc454745013)

[III.2.3.1. Linéarité des principes actifs seuls 49](#_Toc454745014)

[III.2.3.2. Linéarité de la forme pharmaceutique reconstituée 51](#_Toc454745015)

[III.2.3.3. Estimation des droites de régression 53](#_Toc454745016)

[III.2.3.4. Test d'homogénéité des variances : Test de Cochran 54](#_Toc454745017)

[III.2.3.5. Tests de Student 54](#_Toc454745018)

[III.2.3.5.1. Test de comparaison des ordonnées à l’origine des droites de régression avec zéro 54](#_Toc454745019)

[III.2.3.5.2. Test de comparaison des ordonnées à l'origine et des pentes des droites de régression 55](#_Toc454745020)

[III.2.3.6. Tests de Fisher : Test de l'existence d'une pente significative 56](#_Toc454745021)

[III.2.4. Fidélité 56](#_Toc454745022)

[III.2.4.1. Répétabilité 56](#_Toc454745023)

[III.2.4.2. Fidélité intermédiaire 56](#_Toc454745024)

[III.2.4.2.1. Test d'homogénéité des variances : Test de Cochran 57](#_Toc454745025)

[III.2.4.2.2. Évaluation de la fidélité 58](#_Toc454745026)

[III.2.5. L’exactitude 58](#_Toc454745027)

[III.2.5.1. Calcul des recouvrements 58](#_Toc454745028)

[III.2.5.2. Test d'homogénéité des variances : Test de Cochran 58](#_Toc454745029)

[III.2.5.3. Test de validité des moyennes 59](#_Toc454745030)

[III.2.5.4. Estimation de l’intervalle de confiance 59](#_Toc454745031)

[III.3. Application : Dosage du médicament étudié : « Bi-spirogyl » 60](#_Toc454745032)

[III.4. Étude de la stabilité du médicament étudié : « Bi-spirogyl » 61](#_Toc454745033)

[III.4.1. Étude de la stabilité en temps réel 61](#_Toc454745034)

[III.4.2. Étude de la stabilité par dégradation accélérée 62](#_Toc454745035)

[Conclusion 63](#_Toc454745036)

[Conclusion générale 64](#_Toc454745037)

[Références bibliographiques 65](#_Toc454745038)

[Annexes 69](#_Toc454745039)

Liste des figures

[Figure 1 : Société des Industries Pharmaceutiques de Tunisie « SIPHAT » 3](#_Toc454261430)

[Figure 2 : Organigramme de la société 5](#_Toc454261431)

[Figure I‑1 : Médicament étudié « Bi-spirogyl » 8](#_Toc454261432)

[Figure I‑2 : Formule semi-développée de la Spiramycine 10](#_Toc454261433)

[Figure I‑3 : Formule semi-développée du Métronidazole 12](#_Toc454261434)

[Figure I‑4 : Appareil HPLC : Système et principe de fonctionnement 15](#_Toc454261435)

[Figure I‑5 : Temps de rétention 19](#_Toc454261436)

[Figure III‑1 : Spectre UV du PA1 et PA2 46](#_Toc454261438)

[Figure III‑2 : Variation de la résolution des pics en fonction du pH 47](#_Toc454261439)

[Figure III‑3 : Courbe de linéarité du PA1 seul 50](#_Toc454261440)

[Figure III‑4 : Courbe de linéarité du PA2 seul 51](#_Toc454261441)

[Figure III‑5 : Courbe de linéarité du PA1 dans la FPR 52](#_Toc454261442)

[Figure III‑6 : Courbe de linéarité du PA2 dans la FPR 53](#_Toc454261443)

Liste des tableaux

[Tableau I‑1 : Composition de « Bi-spirogyl » 9](#_Toc454374886)

[Tableau I‑2 : Propriétés physico-chimique de la Spiramycine 11](#_Toc454374887)

[Tableau I-3 : Propriétés physico-chimique du Métronidazole 12](#_Toc454374888)

[Tableau I‑4 : Caractéristiques des différentes zones climatiques selon l’OMS 26](#_Toc454374889)

[Tableau I‑5 : Conditions de stockage en cas général 27](#_Toc454374890)

[Tableau II‑1 : Réactifs chimiques et matières premières 30](#_Toc454374891)

[Tableau II‑2 : Équipements utilisés 31](#_Toc454374892)

[Tableau II‑3 : Conditions chromatographiques 32](#_Toc454374893)

[Tableau II‑4 : Étude de la linéarité des principes actifs seuls 35](#_Toc454374894)

[Tableau II‑5 : Étude de la linéarité de la FPR 35](#_Toc454374895)

[Tableau III‑1 : Étude de la spécificité 48](#_Toc454374896)

[Tableau III‑2 : Interprétations des chromatogrammes 49](#_Toc454374897)

[Tableau III‑3: Détermination des LD et LQ du PA1 49](#_Toc454374898)

[Tableau III‑4 : Détermination des LD et LQ du PA2 49](#_Toc454374899)

[Tableau III‑5: Résultats de l’étude de la linéarité du PA1 seul 50](#_Toc454374900)

[Tableau III‑6: Résultats de l’étude de la linéarité du PA2 seul 51](#_Toc454374901)

[Tableau III‑7: Résultats de l’étude de la linéarité du PA1 dans la FPR 52](#_Toc454374902)

[Tableau III‑8 Résultats de l’étude de la linéarité du PA2 dans la FPR 53](#_Toc454374903)

[Tableau III‑9: Estimation des droites de régression pour les PAS 54](#_Toc454374904)

[Tableau III‑10: Estimation des droites de régression pour les FPR 54](#_Toc454374905)

[Tableau III‑11: Résultat du test de Cochran 55](#_Toc454374906)

[Tableau III‑12 : Résultats du test de comparaison des ordonnées à l’origine 56](#_Toc454374907)

[Tableau III‑13 : Résultats du test de comparaison des ordonnées à l'origine et des pentes des droites de régression 56](#_Toc454374908)

[Tableau III‑14 : Résultats du test de l'existence d'une pente significative 57](#_Toc454374909)

[Tableau III‑15 : Résultat de l’étude de la répétabilité 57](#_Toc454374910)

[Tableau III‑16 : Résultat de l’étude de la fidélité intermédiaire pour PA1 58](#_Toc454374911)

[Tableau III‑17 : Résultat de l’étude de la fidélité intermédiaire pour PA2 58](#_Toc454374912)

[Tableau III‑18 ; Résultat du test de Cochran 58](#_Toc454374913)

[Tableau III‑19 : Coefficients de variation 59](#_Toc454374914)

[Tableau III‑20 : Résultats du calcul des taux de recouvrement 59](#_Toc454374915)

[Tableau III‑21 : Résultats du test de Cochran appliqué sur les variances des taux de recouvrement 60](#_Toc454374916)

[Tableau III‑22 : Résultats du test de validité des moyennes 60](#_Toc454374917)

[Tableau III‑23 : Résultats d’estimation de l’intervalle de confiance du recouvrement moyen 60](#_Toc454374918)

[Tableau III‑24 : Teneurs en PA par comprimé 61](#_Toc454374919)

[Tableau III‑25 : Étude de la stabilité de « Bi-spirogyl » en temps réel 62](#_Toc454374920)

[Tableau III‑26 : Étude de la stabilité de « Bi-spirogyl » par dégradation accélérée 63](#_Toc454374921)

Liste des abréviations

**AAM :** Autorisation de Mise sur le Marché

**C :** Fonction de Cochran

**Cp :** Comprimé

**CV :** Coefficient de variation

**DAD :** Détecteur à barrette d’iode

**DDL :** Degré de liberté

**F :** Fonction de Fisher

**FDA :** Food and Drug Administration

**FPR :** Forme pharmaceutique reconstituée

**HEPT :** Hauteur équivalente à un plateau théorique

**HPLC :** Chromatographie Liquide Haute Performance

**ICH :** International Conference on Harmonisation

**K :** Coefficient de distribution

**k’ :** Facteur de capacité

**LD :** Limite de détection

**LQ :** Limite de quantification

**N :** Nombre de plateaux théoriques

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**PA :** Principe actif

**PAS :** Principe actif seul

**RS :** Résolution

**SE :** Solution essai

**SIPHAT :** Société des Industries Pharmaceutiques de Tunisie « SIPHAT »

**ST:** Solution témoin

**t :** Fonction de Student

**tM :** Temps mort

**tR:** Temps de rétention

**t’R**: Temps de rétention réduit

**UICPA :** Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

**UV :** Ultra-Violet

**α :** Facteur de symétrie

Introduction générale

Le développement d’un médicament est un procédé long. Il implique la découverte de la molécule du principe actif, les essais laboratoires, les études sur l’animal, les essais cliniques et les enregistrements réglementaires. Afin d’améliorer l’efficacité et la sécurité du médicament après sa mise sur le marché, les agences réglementaires exigent le test de l’identité, du dosage, de la qualité, de la pureté et de la stabilité du médicament avant libération. Les fabricants de médicaments se trouvent donc obligés de démontrer qu’ils contrôlent les aspects critiques de leurs opérations spécifiques. Pour cette raison, la validation pharmaceutique et les contrôles de procédé sont importants. La validation est l'expression complète d’une séquence d'activités ayant pour but de démontrer et de documenter qu'un médicament peut être fabriqué de façon fiable par des procédés déterminés, avec une qualité appropriée pour une utilisation destinée. L’objectif d’une telle démarche est d’aider les laboratoires de contrôle des médicaments et les spécialistes en industrie pharmaceutique, de réduire le temps et le coût de l’analyse et par la suite de minimiser les rejets chimiques. Dans ce cadre, le sujet traité concerne l’optimisation et la validation d’une méthode de dosage simultané de deux principes actifs par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), dont le but d’obtenir une méthode analytique simple, rapide et économique. La validation de cette méthode repose sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à une méthode analytique permettant de donner des résultats fiables et de montrer qu’elle correspond à l’utilisation pour laquelle elle est proposée. Après une brève présentation de l’entreprise, notre travail est présenté sous forme de trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique, le deuxième est dédié à la présentation de la méthodologie de travail et des matériels utilisés. Finalement, nous citerons les différents résultats obtenus durant notre travail.

# Avant-propos

Présentation de l’entreprise

## 1. Généralité sur l’entreprise

La société des industries pharmaceutiques de Tunis « SIPHAT » est une société anonyme au capital actuel de 9.000.000 DT. Elle a été créée en avril 1989 dans le cadre de la restriction de la pharmacie centrale de Tunis (PCT) qui a été scindée en deux structures :

* Une structure chargée de la production des médicaments « SIPHAT ».
* Une structure chargée de leur commercialisation «PCT ».

La SIPHAT emploie près de 700 personnes réparties dans différentes directions, départements, services et sections. Elle est spécialisée dans le développement, la fabrication et la vente des médicaments sous différentes formes.



Figure  : Société des Industries Pharmaceutiques de Tunisie « SIPHAT »

## 2. Activité

Parmi la trentaine d'entreprises privées et publiques, la SIPHAT assure le quart de la production nationale et couvre 10% des besoins du pays en médicaments. La production de la SIPHAT couvre 14% de la production nationale destinée aussi bien au secteur hospitalier que officinal. Quatre-vingt-cinq pour cent de la valeur de cette production concerne des spécialités développées au sein de la SIPHAT et 15% de cette valeur étant réalisés par des produits sous licence.

## 3. Équipements de production

Les missions de la SIPHAT concernent le développement de toute recherche fondamentale ou appliquée ayant trait aux médicaments et ses applications, l'étude de la mise en point, la fabrication, la transformation, le dosage, le conditionnement et la vente de tous produits pharmaceutiques destinées à être utilisés en médecine humaine ou vétérinaire, ainsi que tous les articles de pansements et produits diététiques, hygiéniques destinées aux soins. Avec ses chaînes de fabrication de pointe, ses machines de remplissage, de stérilisation, de conditionnement, de contrôle, etc. La SIPHAT garantit une croissance régulière pour une capacité de production optimale répondant aux attentes de ses partenaires.

## 4. La gamme de spécialités pharmaceutique produites par la SIPHAT

La SIPHAT commercialise 147 spécialités différentes classées comme suit :

* Formes sèches : 64 spécialités
* Formes pâteuses : 19 spécialités de suppositoires et 18 spécialités de pommade
* Formes liquides stériles : 21 spécialités
* Formes liquides non stériles : 25 spécialités

Exemples de quelques produits pharmaceutique fabriques par la SIPHAT :

* Allergologie : Prométhazine comprimé dragéifié 25mg, etc.
* Antalgiques : Analgan 500mg comprimé, Aspirine 500mg comprimé, etc.
* Anti-inflammatoire : Indocine 50 mg suppositoire, Bi-tiapram 200 mg comprimé sécable, etc.
* Infectiologie : Bi-spirogyl 1,5 MUI / 250 mg comprimé pelliculé, Erythro 250mg comprimé Enrobé, etc.
* Métabolisme et nutrition : Formidab 850mg comprimé pelliculé, vitamine C 500mg comprimé, etc.
* Pneumologie : Bronchothiol sirop adulte FL/ 200ml, Calmatux sirop adulte FL/200ml, etc.
* Rhumatologie : Niflumic crème dermique, Myorelax crème dermique, etc.
* Système Cardio-vasculaire : Fenothyl 160 mg comprimé pelliculé, etc.

## 5. Structure de la société

L’organisation générale de la société se traduit à travers l’organigramme suivant :

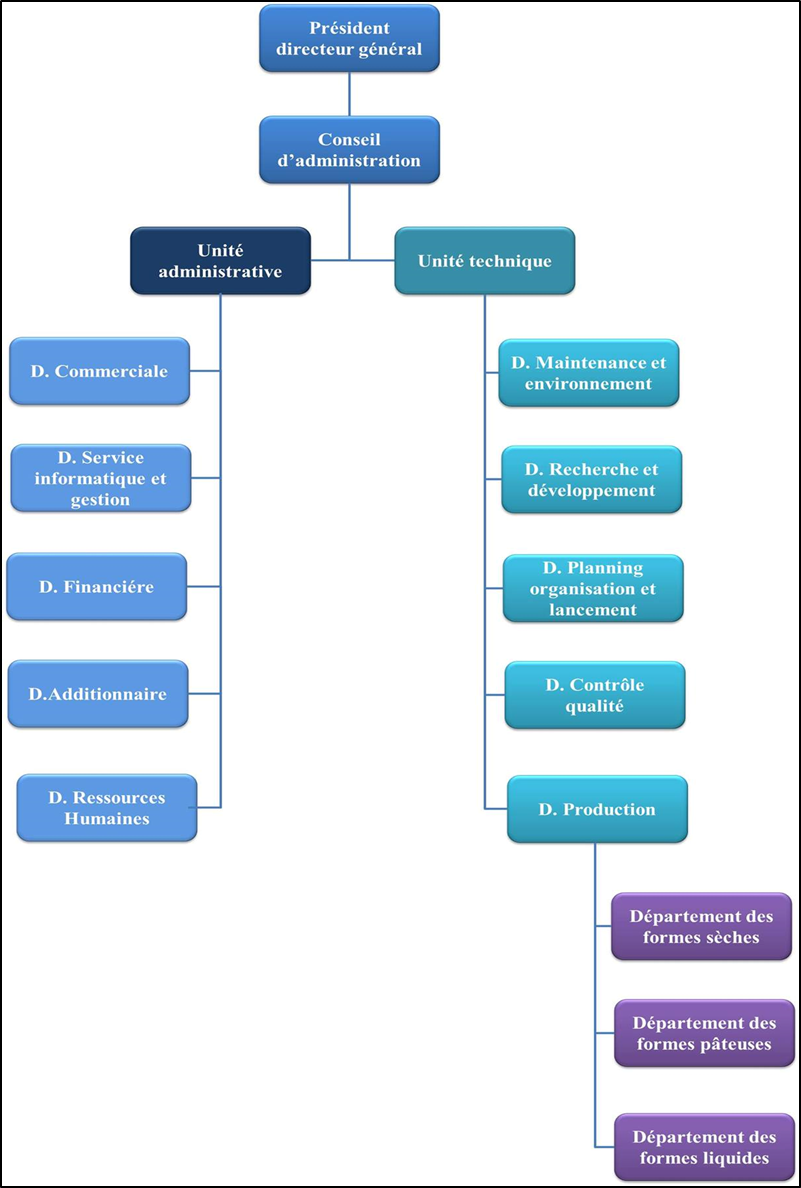


Figure  : Organigramme de la société

## 

# 

# Étude bibliographique

## Introduction

Ce premier chapitre est consacré pour introduire des notions de base en chimie analytique. Au début**,** nous présentons des généralités sur les médicaments en précisant notre médicament étudié ainsi que les principes actifs qu’il conjugue. Nous expliquons par la suite, la technique de dosage par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Après, nous présentons les paramètres influençant l’optimisation d’une méthode d’analyse. Puis, nous citons les critères d’une validation analytique et nous finissons, par faire une étude de stabilité des médicaments dans le but d’avoir une idée sur les conditions de stockage.

## I.1. Généralités sur le médicament

### I.1.1. Définition d'un médicament

Selon le code de la santé publique (art. L. 5121-1),un médicament est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. [1]

### I.1.2. La composition d'un médicament

Un médicament est généralement constitué d’un principe actif et des excipients.

#### I.1.2.1. Principe actif

Il s'agit d’une substance présente dans le médicament qui lui confère ses propriétés thérapeutiques, diagnostiques ou préventives. Cette substance existe en très faible proportion dans le médicament par rapport aux autres constituants. Elle peut être naturelle ou synthétique, chimiquement pure ou non, mélange de plusieurs substances chimiquement proches (isomères par exemple) ou encore une substance définie par son mode d’obtention. [2]

#### I.1.2.2. Les excipients

Les excipients sont des substances sans activité pharmacologique. Ils servent notamment à mettre en forme le médicament et à amener le principe actif dans l’organisme à l’endroit où il doit agir. Ils ont un rôle dans l’absorption et la stabilité du médicament et conditionnent son aspect, sa couleur et son goût. [3]

### I.1.3. Médicaments princeps

Un médicament princeps ou médicament d’origine est un médicament mis au point par un laboratoire pharmaceutique qui en garde l’exclusivité jusqu’à expiration du brevet (environ 10 ans d'exploitation). À l’expiration du brevet, une copie du produit original peut ensuite être développée et commercialisée par d'autres laboratoires : c'est le médicament générique. [4]

### I.1.4. Médicaments génériques

Un médicament générique est une copie d’un médicament original, mais pas nécessairement une copie strictement identique. Il doit avoir la même composition qualitative et quantitative en principes actifs, la même forme pharmaceutique que la spécialité de référence et démontrer la bioéquivalence avec cette dernière, c’est-à-dire la même biodisponibilité dans l’organisme et en conséquence la même efficacité. Il peut présenter des différences, à condition qu’elles n’affectent pas la bioéquivalence du médicament générique par rapport au médicament de référence, seule garantie d’une activité thérapeutique identique. En d’autres termes, ces différences ne doivent pas modifier la quantité et la vitesse auxquelles le principe actif est libéré dans l’organisme. [3]

### I.1.5. Présentation du médicament étudié : « Bi-spirogyl »

#### I.1.5.1. Généralités



Figure I‑ : Médicament étudié « Bi-spirogyl »

Le médicament étudié « Bi-spirogyl » (Figure I-1) est un antibactérien à usage systématique conjuguant deux principes actifs : la Spiramycine et le Métronidazole. Il est indiqué chez l’adulte et l’enfant (15 ans et plus). Il est commercialisé sous forme de comprimés pelliculés, dans des boites de 10 ou 20 comprimés. Le tableau I-1 présente les concentrations des différentes substances actives. [5]

Tableau I‑ : Composition de « Bi-spirogyl »

|  |  |
| --- | --- |
| Substance | Concentration (mg/comprimé) |
| Spiramycine | 150 |
| Métronidazole | 250 |

Les autres composants sont : cellulose microcristalline, amidon de maïs, povidone croscaramellose sodique, silice colloïdale, stéarate de magnésium, hypromellose, acide stéarique, dioxyde de titane, jaune orangé S (E110) et rouge cochenille (E124). [5] En effet, les comprimés sont des formes pharmaceutiques solides, destinées à la voie orale, équivalent à une dose (unité de prise) qui peut contenir une ou plusieurs substances actives. Les comprimés sont obtenus en agglomérant par compression un volume de particules (poudre ou granule). Les comprimés sont avalés ou croqués, dissous ou désagrégés dans de l’eau et certains doivent rester dans la bouche pour y libérer la substance (comprimé à sucer ou sublingual). Les comprimés pelliculés sont enrobés d'une couche supplémentaire permettant de les avaler plus facilement. [6]

#### I.1.5.2. Indications

Ce médicament est une association de deux antibiotiques de la famille des macrolides et des imidazolés. Il est préconisé dans :

* Le traitement des infections buccales et dentaires (abcès dentaires, phlegmons, infections des glandes salivaires).
* La prévention des infections locales pouvant survenir après une chirurgie de la bouche et des dents.

Ce médicament ne doit pas être utilisé dans les cas suivants :

* Allergie connue aux macrolides et aux imidazoles.
* En cas d’utilisation du disulfirame.
* Chez les enfants de moins de 6 ans, en raison de la forme pharmaceutique. [5]

#### I.1.5.3. Mode d'administration et posologie

Le comprimé pelliculé « Bi-spirogyl » est administré par voie orale à raison de deux à trois comprimés, deux à trois prises par jour à prendre au moment des repas. [5]

#### I.1.5.4. Les effets indésirables

Comme tout produit actif, « Bi-spirogyl », comprimé pelliculé peut chez certaines personnes entrainer des effets plus ou moins gênants :

* Troubles digestifs : crampes au niveau de l’estomac, nausées, vomissement, diarrhée.
* Urticaire (éruption cutanée analogue à celle que provoque la piqure d’ortie), démangeaisons, œdème de Quincke (variété d’urticaire avec brusque gonflement du visage et du cou).
* Gout métallique dans la bouche, inflammation de la langue avec sensation de bouche sèche, inflammation de la muqueuse de la bouche, anorexie (perte d’appétit). [5]

#### I.1.5.5. Présentation des principes actifs de « Bi-spirogyl »

Ce médicament présente deux principes actifs : la Spiramycine et le Métronidazole.

##### I.1.5.5.1. Spiramycine

La Spiramycine, (Figure I-2) est un antibiotique antibactérien de la classe des macrolides obtenu par fermentation de certaines souches de Streptomyces ambofaciens ; mélange de trois composés, tous à 16 chaînons : la Spiramycine I très majoritaire et les Spiramycines II et III. La Spiramycine inhibe la synthèse protéique bactérienne par fixation au ribosome bactérien. [7] L’ensemble de ces propriétés physico-chimiques sont regroupés dans le tableau I-2. [8]

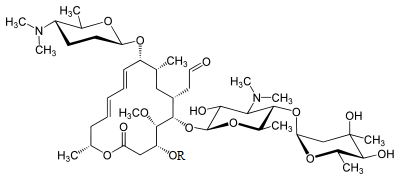


Figure I‑ : Formule semi-développée de la Spiramycine

**Tableau I‑2 : Propriétés physico-chimique de la Spiramycine**

|  |  |
| --- | --- |
| Nom commercial | Spiramycine |
| Nom systématique  (UICPA) | 2-[(4R,5S,6S,7R,9R,10R,11E,13E,16R)-6-[5-(4,5-dihydroxy-4,6-dimethyloxan-2-yl)oxy-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-10-[5-(dimethylamino)-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-hydroxy-5-methoxy-9,16-dimethyl-2-oxo-1-oxacyclohexadeca-11,13-dien-7-yl]acetaldehyde |
| Formule brute | * Spiramycine I : R = H, C43H74N2O14 * Spiramycine II : R = CO-CH3, C45H76N2O15 * Spiramycine III : R = CO-CH2-CH3, C46H78N2O15 |
| Masse moléculaire  (g/mol) | * Spiramycine I : 843,1 * Spiramycine II : 885,1 * Spiramycine III : 899,1 |
| Point de fusion (°C) | 151 |
| Solubilité | * Peu soluble dans l’eau * Facilement soluble dans l’acétone * Dans l’éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol |
| pKa | 8 à 9 |
| Aspect | Poudre blanche ou faiblement jaunâtre, faiblement hygroscopique |

##### I.1.5.5.2. Métronidazole

Le Métronidazole, (Figure I-3) est un antibiotique et antiparasitaire appartenant aux nitroimidazoles. Il inhibe la synthèse des acides nucléiques et est utilisé pour le traitement des infections liées à des bactéries anaérobies ainsi qu'à des protozoaires. Il est utilisé dans le traitement curatif des infections médico-chirurgicales à germes anaérobies sensibles ; comme stimulant, en raison de son action sur le système nerveux central. [9] L’ensemble de ces propriétés physico-chimiques sont regroupés dans le tableau I-3. [8]

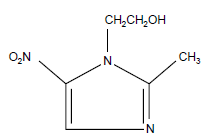


Figure I‑ : Formule semi-développée du Métronidazole

Tableau I- : Propriétés physico-chimique du Métronidazole

|  |  |
| --- | --- |
| Nom commercial | Métronidazole |
| Nom systématique (UICPA) | 2-(2-Méthyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl) éthanol |
| Formule brute | C6H9N3O3 |
| Masse moléculaire (g/mol) | 171,2 |
| Point de fusion (°C) | 159-163 |
| Solubilité | Peu soluble dans l’eau, dans l’acétone, dans l’alcool et dans le chlorure de méthylène. |
| pKa | 2,38 |
| Aspect | Poudre cristalline, blanche ou jaunâtre. |

## I.2. La chromatographie

### I.2.1. Historique

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes de séparation mettant en jeu différents processus physicochimiques. Historiquement, l’apparition de ces techniques remonte à 1903, date à laquelle le botaniste russe M.Tswett a réalisé la séparation de pigments végétaux de la chlorophylle sur une colonne remplie de carbonate de calcium avec de l’éther de pétrole. La séparation du mélange en différentes bandes colorées a donné son nom à la méthode chromatographique (du grec khroma qui signifie couleur). Alors que cette première séparation était basée sur les différences d’adsorption des pigments. Des évolutions ont suivi la première expérience de Tswett. L’origine de l’efficacité des techniques chromatographiques réside incontestablement dans le fait que les constituants du mélange à résoudre entrent dans une suite continue d’un nombre considérable d’équilibre avec deux phases :

* L’une stationnaire, s’appelle phase fixe.
* L’autre dite mobile qui parcourt la première avec une vitesse déterminée. [10]

### I.2.2. Intérêt de la chromatographie

Les méthodes chromatographiques sont les méthodes les plus importantes de l’analyse immédiate. Elles permettent de séparer les constituants d’un mélange plus ou moins complexe. Elles peuvent également assurer, dans certaines conditions, l’identification et la détermination quantitative des substances. [10]

* **Les différentes méthodes chromatographiques**

Il existe trois principaux types de chromatographie :

* La chromatographie en phase gazeuse (CPG).
* La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).
* La chromatographie en couche mince (CCM).

### I.2.3. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

#### I.2.3.1. Généralité

La chromatographie en phase liquide à haute performance, fréquemment appelée par son abréviation (HPLC) (High Performance Liquid Chromatography) constitue une technique analytique très générale d’emploi. Elle permet de séparer les composés en solution afin de déterminer leurs teneurs. La séparation analytique repose sur la distribution différentielle des espèces par deux phases non miscibles, l'une stationnaire et l'autre mobile. [11] Selon la nature des interactions entre ces deux phases et l’échantillon analysé, il est possible de distinguer différents mécanismes de séparation :

* La Chromatographie d’adsorption.
* La Chromatographie de partage (en phase normale ou en phase inverse).
* La Chromatographie ionique.
* La Chromatographie d’exclusion stérique. [11]

#### I.2.3.2. Principe

Les composés à séparer sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. [12]

#### I.2.3.3. Appareillage

Le schéma général d’un système chromatographique en phase liquide est indiqué sur la figure I-4. Ce système comprend :

* L’éluant qui peut constituer une phase mobile de composition constante (système isocratique) ou variable en fonction du temps (système à gradient).
* Un système de pompage.
* Un système d’injection.
* Une colonne.
* Un détecteur avec un intégrateur.

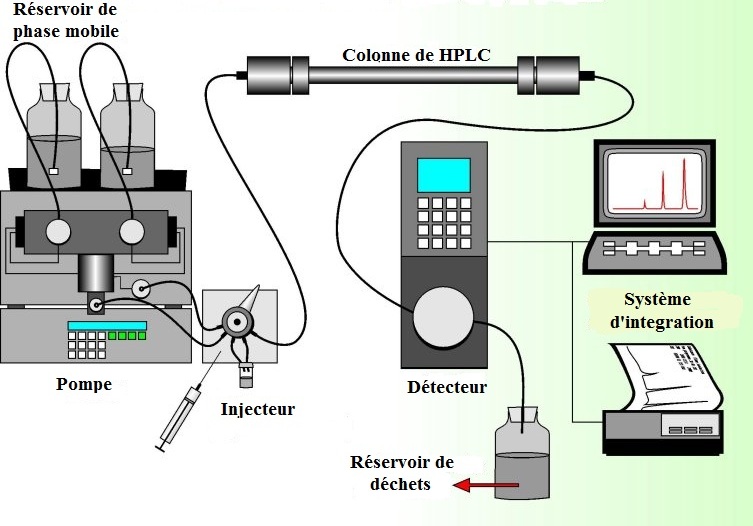


Figure I‑ : Appareil HPLC : Système et principe de fonctionnement

##### I.2.3.3.1. Réservoir de la phase mobile

La phase mobile est pompée à partir d'un réservoir, le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S’il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d’hélium. [12]

##### I.2.3.3.2. Le système de pompage

Toute installation de HPLC comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l’injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) selon le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que la nature de la phase stationnaire. Une pompe peut fournir une composition constante en phase mobile (mode isocratique) ou une composition variable en phase mobile (mode gradient). [13]

* **Mode isocratique :** En mode isocratique, la composition de la phase mobile demeure constante durant toute l'analyse chromatographique. Si on travaille toujours dans ces conditions, on peut utiliser un système qui ne comporte qu'un seul canal pour le solvant, provenant d'une seule bouteille. [14]
* **Mode gradient :** Les appareils de chromatographie liquide, HPLC, permettent de faire des analyses chromatographiques en mode gradient, c'est-à-dire en faisant varier la composition du liquide porteur en cours d'analyse, en pompant les solvants contenus dans 2 à 4 réservoirs. [14]

##### I.2.3.3.3. L'injecteur

L’injecteur, sert à placer l’échantillon liquide dans le flux de la phase mobile. L’injection d’un volume précis de l’échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref aﬁn de stabiliser le maximum possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable dès la colonne au détecteur. [13] L’injection de l’échantillon se fait de deux manières :

* **Manuelle :** L’injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montées sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L’échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l’échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile. [15]
* **Automatique :** L’injection se fait automatiquement, l’injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d’échantillonnage d’une capacité fixe, cette boucle permet d’introduire l’échantillon sans modifier la pression dans la colonne. [15]

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 µL, etc.). Elle possède deux positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe et la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique. [12]

##### I.2.3.3.4. La colonne

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre se différent selon les modèles. Les colonnes « standard » ont un diamètre interne d’environ 4,5 mm et une longueur de 10 cm. [13] Le choix d’une colonne HPLC est lié aux paramètres suivants :

* Type de la phase stationnaire.
* Longueur.
* Diamètre des particules.
* Débit de la phase mobile supportable.
* pH de la phase mobile.

1. La phase stationnaire

En chromatographie de partage, la phase stationnaire est souvent composée de particules de silice sur lesquelles des groupements organiques vont être greffés. Ces groupements de nature et composition différentes seront choisis en fonction des propriétés compatibles avec les composés à séparer. Dans le cas de la chromatographie de partage, deux genres sont à distinguer :

* La chromatographie de partage à polarité de phases normale.
* La chromatographie de partage à polarité de phases inversée. [11]
* **La phase stationnaire normale**

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser 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. [16]

* **La phase stationnaire inversée**

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire tels que l’acétonitrile, le méthanol et l’eau. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. [16]

###### La phase mobile

Selon la polarité de la phase stationnaire, on peut distinguer deux cas :

* Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire.
* Si la phase stationnaire est apolaire, on choisira une phase mobile polaire, généralement un mélange eau (ou tampon) / solvant organique tel que l’acétonitrile, le méthanol, l’éthanol, etc. [16]

##### I.2.3.3.5. Le détecteur

Le détecteur a pour but de fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de composition de l’éluant à la sortie de colonne ce qui permet de détecter les différents composés existant dans l’éluant. Le choix d’un détecteur dépend à la fois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires.

On distingue différents systèmes de détection en chromatographie liquide, tels que :

* Détecteur UV –Visible.
* Détecteur à indice de réfraction.
* Détecteur à fluorescence. [17]

Cependant, le détecteur UV-visible est l'un des plus utilisé en chromatographie liquide. Le principe du détecteur UV –Visible est fondé sur la loi de Beer-Lambert, qui relie l'absorbance optique d'un composé à sa concentration. Les détecteurs de base permettent de faire la détection à une seule longueur d'onde à la fois, donc avec une radiation monochromatique. Il faut alors, préalablement à l'analyse, connaître le spectre d'absorption UV-visible du ou des composés à analyser par contre plusieurs appareils modernes offrent une détection multicanaux ou opèrent avec une barrette de diodes de détection (DAD), qui permettent de mesurer l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde simultanément. [14]

##### I.2.3.3.6. L’enregistreur

L’enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l’analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme.

### I.2.4. Grandeurs chromatographiques

#### I.2.4.1. Temps de rétention (tR)

Un constituant est caractérisé par son temps de rétention tR qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui au maximum du pic qui lui correspond sur le chromatogramme. Dans le cas idéal tR est indépendant de la quantité injectée. Un constituant non retenue sort de la colonne au temps tM, appelé temps mort (désigne également par t0). La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé t’R. [18]

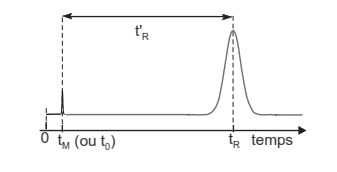


Figure I‑ : Temps de rétention

#### I.2.4.2. Coefficient de distribution (K)

En chromatographie les constituants d’un mélange se partagent entre deux phases, l’une mobile et l’autre stationnaire. Ce phénomène est dynamique, les molécules passent continuellement d’une phase à l’autre créant un état d’équilibre entre les deux phases pour un constituant en particulier. À l’état d’équilibre, on appelle coefficient ou constante de distribution K, le rapport des concentrations du composé se trouvant dans les deux phases.



Où :

: Concentration dans la phase stationnaire. : Concentration dans la phase mobile.

Plus K est grand, plus le composé est absorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement. La valeur de K, qui est une constante thermodynamique, dépend de :

* La structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des phases.
* La nature de la phase stationnaire et de la phase mobile.
* La température. [18]

#### I.2.4.3. Facteur de capacité (k’)

Ce facteur s’apparente au coefficient de partage .En effet, il exprime le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile. Ce facteur sans dimension, peut être relié au temps de rétention. Il a l’avantage de ne dépendre ni du débit ni de la longueur de la colonne. Il est facilement calculé pour une substance dont le temps de rétention est tR par l’expression :

 [18]

#### I.2.4.4. Facteur de sélectivité (α)

Le facteur de sélectivité ou de séparation, sans dimension, exprime la qualité de la séparation entre deux pics chromatographiques. Il est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. Il s’exprime comme suit :



Où :

 : Facteur de capacité du composé 2.  : Facteur de capacité du composé 1. [18]

#### I.2.4.5. Nombre de plateaux théoriques (N)

L’efficacité d’une colonne analytique d’une chaine HPLC peut s’exprimer par le nombre N de plateaux théoriques. Plus le nombre des plateaux théoriques N est élevé, plus la colonne est efficace. On définit également HEPT, la hauteur équivalente à un plateau théorique, et L, la longueur de la colonne. Plus la hauteur du plateau HEPT est faible, plus la colonne est efficace. On peut définir la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) :



Avec :

: Le nombre total de plateaux théoriques dans une colonne. : La longueur de cette colonne.

Le nombre N est également lié aux paramètres chromatographiques par les relations suivantes :

 Et 

Où :

 : Largeur du pic à la base.  : Largeur du pic à mi-hauteur. [18]

#### I.2.4.6. Résolution (Rs)

Elle représente un facteur de séparation chromatographique entre deux composés d'un mélange, c'est-à-dire deux pics de temps de rétention t1 et t2 et de largeur à mi-hauteur W1 et W2. Une résolution de 1 indique que ces deux composés sont résolus à la ligne de base, donc totalement séparés l'un par rapport à l'autre. La résolution peut aussi être calculée d’après l’équation suivante :

 [18]

## I.3. Paramètres influençant l’optimisation d’une méthode de dosage

L’optimisation une méthode analytique, consiste à conserver la même technique d’analyse. Cependant, des éléments tels que la colonne chromatographique, la phase mobile, le pH de la phase mobile, le débit et la température seront modifiés par rapport à la méthode actuelle. Ces modifications vont permettre :

* Une réduction dans le temps global de l’analyse.
* Une réduction de la consommation de solvant.
* Une amélioration des paramètres chromatographiques.

### I.3.1. La colonne chromatographique

L’utilisation d’une nouvelle colonne chromatographique et donc la modification de la phase stationnaire permettent de :

* Avoir plusieurs analyses en une (exemple : dosage du principe actif et de ses impuretés).
* Diminuer le temps de l’analyse.
* Améliorer la sensibilité. [11]

### I.3.2. La phase mobile

La phase mobile est l’un des principaux facteurs qui influencent sur la séparation des solutés. Le type de la phase mobile utilisé peut avoir un grand effet sur la rétention. La principale exigence pour la phase mobile est qu’elle doit être composée des solvants miscibles et qu’elle doit dissoudre les analytes à la concentration appropriée pour la détection. [19]

### I.3.3. Le pH de la phase mobile

Il est important de contrôler le pH de la phase mobile. En effet, en chromatographie liquide à haute performance de phase inversée, la rétention augmente avec l’hydrophobicité des produits. Les composés ionisables sont donc plus retenus sous leur forme neutre que sous leur forme ionique. L’ionisation étant un phénomène dépendant du pH, il est donc important de tester l’influence de ce facteur sur la rétention. [11]

### I.3.4. La température

La température appliquée à la colonne lors de l’analyse permet aussi d’optimiser la séparation. Son augmentation peut diminuer la rétention des composés et faciliter leur séparation. Ceci est dû au fait que l’augmentation de la température va diminuer la viscosité de la phase mobile. Cependant une température trop élevée peut diminuer la durée de vie des colonnes et dégrader les composés qui sont thermosensibles. Il est donc nécessaire de contrôler ce paramètre. [11]

## I.4. Validation d’une méthode analytique

### I.4.1. Définition

Selon la norme ICH (International Conference on Harmonisation), la validation d’une méthode est définie comme étant l’ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé. [20]

### I.4.2. Objectif de la validation

L’objectif de la validation est de :

* Donner des garanties quant à l’aptitude de la méthode analytique à quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à quantifier à l’avenir.
* S’assurer qu’une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles. [21]

### I.4.3. Les critères de validation analytique

La caractérisation d’une méthode nécessite l’évaluation d’un certain nombre de critères.

#### I.4.3.1. La Spécificité

La spécificité est la capacité de la méthode à déterminer sans équivoque, l'analyte en présence. Elle garantit que le signal mesuré provient uniquement de la substance à analyser ou permet de mettre en évidence les interactions entre les molécules présentes de façon concomitante dans l'échantillon. [22]

#### I.4.3.2. La Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon. Le modèle étudié ici est un modèle linéaire d'équation y = bx + a. [22]

#### I.4.3.3. La Fidélité

La fidélité est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

##### I.4.3.3.1. La répétabilité

C'est l'étroitesse de l'accord entre les mesurages successifs de la même quantité, effectués dans les mêmes conditions de mesurage [23].Les conditions de répétabilité sont réalisées lorsque « les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps ». [24]

##### I.4.3.3.2. La fidélité intermédiaire

C'est l'étroitesse de l'accord entre les mesurages successifs de la même quantité, effectué dans des conditions spécifiques. Les conditions de la fidélité intermédiaire sont réalisées lorsqu’on fait changer un seul paramètre des conditions opératoires pour la réalisation des essais. [24]

#### I.4.3.4. L’exactitude

Selon l’ICH l’exactitude d’une procédure analytique exprime l’étroitesse de l’accord entre la valeur qui est acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois. [25]

#### I.4.3.5. La Limite de détection (LD)

La limite de détection d'une méthode d'analyse est la plus petite quantité d’analyte qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte. [26]

#### I.4.3.6. La Limite de quantification (LQ)

La limite de quantification d'une méthode d'analyse est la quantité la plus faible d’analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement. [26]

## I.5. Études de stabilité des médicaments

Les essais et la surveillance de la stabilité constituent une étape cruciale dans la recherche, le développement et la fabrication des médicaments. Ils influencent le mode de fabrication, d‘emballage, d‘étiquetage et de vente des produits pharmaceutiques. La création de conditions environnementales exactes lors d‘un essai de stabilité est certes complexe, mais nécessaire pour se conformer aux normes définies par les organismes de réglementation comme la FDA et l‘ICH, ainsi que pour assurer la sécurité et l‘efficacité des produits pharmaceutiques. [27]

### I.5.1. Définition

Selon l’ICH, la stabilité d’un médicament peut être définie comme son aptitude à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité. [28]

### I.5.2. Objectifs des études de stabilité

Avant toute autorisation de mise sur le marché (AMM), tous les médicaments sont soumis à des essais de stabilité dans des conditions standardisées internationalement reconnues [29]. Les essais de stabilité ont pour but de fournir des données probantes sur la façon dont la qualité d’un principe actif ou d’un produit médicamenteux varie en fonction du temps sous l’effet de divers facteurs environnementaux, comme la température, l’humidité et la lumière, permettant ainsi de définir les conditions de conservation et de déterminer la durée de validité des produits. [28] Nous entendons par modification importante de la stabilité :

* Baisse de 5% de la teneur en principe actif par rapport à la valeur initiale.
* Présence de produit de dégradation en quantité supérieure par rapport aux spécifications (risque toxique ou d’inactivation).
* pH en dehors des valeurs spécifiées. [30]

### I.5.3. Types d’étude de stabilité

Il existe deux types d’études de stabilité :

#### I.5.3.1. Les études de dégradation accélérée

Elles sont destinées à augmenter la vitesse de dégradation chimique ou physique d'un médicament en le soumettant à des conditions de stockage extrêmes dans le cas du programme réglementaire des études de stabilité. [30]

#### I.5.3.2. Les études de stabilité en temps réel

Elles se basent sur les études expérimentales des caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et microbiologiques d'un médicament pendant sa durée de validité et d'utilisation prévue et au-delà, dans des conditions de stockage prévues pour le marché auquel il est destiné. Il est donc nécessaire d'effectuer des études de stabilité en fonction des conditions climatiques du pays de destination. À cet effet, le monde a été divisé selon les recommandations de l'OMS en quatre grandes zones climatiques, les fabricants devant adapter leurs études au marché visé. Les conditions climatiques moyennes rencontrées dans ces zones ainsi que les conditions de stockage dérivées pour les études de stabilité en temps réel sont présentées dans le tableau I-4. [31]

Tableau I‑ : Caractéristiques des différentes zones climatiques selon l’OMS

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Zones climatiques | Conditions d’étude de stabilité en temps réel | |
| **Températures** | **Hygrométries** |
| Zone I : Climat tempéré | 21°C | 45 % HR |
| Zone II : Climat méditerranéen et subtropical avec possibilité de forte humidité | 25° C | 60 % HR |
| Zone III : Climat chaud et sec | 30° C | 35 % HR |
| Zone IV : Climat chaud et humide | 30° C | 65 % HR |

### I.5.4. Durée et conditions de stockage et de conservation des médicaments

La durée et les conditions de conservation des médicaments sont fixées en fonction des résultats de ces essais de stabilité [29]. Les conditions à utiliser pour une étude de stabilité classique d’après le guide ICH Q1A sont illustrées dans le tableau I-5. [32]

Tableau I‑ : Conditions de stockage en cas général

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Étude de stabilité | Conditions de stockage | | Période minimale avant demande d’enregistrement |
| **Températures** | **Hygrométries** |
| Temps réel | 25°C ± 2°C | 60% HR ± 5% HR | 12 mois |
| Intermédiaire | 30°C ± 2°C | 65% HR ± 5% HR | 6 mois |
| Accélérée | 40°C ± 2°C | 75% HR ± 5% HR | 3 mois |

### I.5.5. Les tests pharmaco-techniques

Les tests pharmaco-techniques occupent une place très importante dans le contrôle de qualité des médicaments, ils assurent avec les tests physiques, chimiques et biologiques la qualité, l’efficacité et la sécurité de leurs utilisations. Parmi les principaux tests pharmaco-techniques, nous pouvons citer :

#### I.5.5.1. Contrôle de l’aspect du produit fini

Pour les formes pharmaceutiques, l’aspect du produit à l’ouverture permet facilement de juger si l'apparence extérieure est modifiée ou non. Si c’est le cas, il ne devrait pas être utilisé. En effet, cette altération de l'aspect extérieur pourrait indiquer une modification des propriétés de la forme pharmaceutique. [31]

#### I.5.5.2. Contrôle de la masse moyenne

Cet essai présente un intérêt dans le contrôle de la masse moyenne des comprimés. En effet, si la masse moyenne est constante, nous pouvons être sûrs qu’on a une production homogène de ces comprimés. [33]

#### I.5.5.3. Test de désagrégation

Cet essai est destiné à déterminer l’aptitude des comprimés à se désagréger dans un temps prescrit en milieu liquide et dans des conditions expérimentales bien définies. La désagrégation n’implique pas une dissolution complète de l’unité soumise à l’essai ni de son composant actif. La désintégration est complète lorsqu’il ne subsiste aucun résidu sur la grille à l’exception des fragments insolubles de l’enrobage et s’il reste un résidu il ne doit pas contenir un noyau palpable. [34]

#### I.5.5.4. Dosage

Le dosage est primordial, en fait, il permet de définir si le principe actif a été dégradé ou non. Il est très fréquemment réalisé à l’aide d’une HPLC.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons détaillé les différentes notions qui seront utiles pour montrer notre but, qui consiste à réaliser un dosage simultané de la Spiramycine et du Métronidazole par HPLC, d’où découle le chapitre qui suive qui sera consacré au développement de cette méthode de dosage.

# 

# Matériels et méthodes

## Introduction

Dans la pratique courante, après l’étape d’optimisation, il devient de plus en plus évident de démontrer à l’aide de la validation qu’une méthode optimisée correspond à l’usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables et reproductibles. Dans cette partie, nous nous intéressons d’abord, à la préparation des solutions nécessaires, d’une part, pour l’optimisation et la validation de la méthode analytique et d’autre part pour le dosage des principes actifs. Nous présentons par la suite, les différentes étapes à réaliser pour valider la méthode de dosage. Nous commençons, par une étude de la spécificité, pour passer ensuite à l’étude de la linéarité et la fidélité et nous finirons par une étude d’exactitude. Enfin, nous abordons plus spécifiquement la réalisation des études de stabilité.

## II.1. Réactifs et échantillons de matières premières utilisés

Le tableau II-1 présente les réactifs chimiques et les échantillons de matières premières utilisés durant notre étude.

Tableau II‑ : Réactifs chimiques et matières premières

|  |  |
| --- | --- |
| Les réactifs | Les matières premières |
| Méthanol (CH3OH) | Spiramicyine |
| Acétonitrile (CH3CN) | Métronidazole |
| Phosphate de potassium monobasique (KH2PO4) | Sepifilm LP 014 |
| Acide ortho-phosphorique (85%) (H3PO4) | Aerosil 200=SI |
| Eau distillée | Amidon de Mais |
|  | Stéarate de Magnésium |
|  | Cellulose Microc=Vivapeur 101 |

## 

## II.2. Appareillage

Les appareils utilisés pendant le protocole expérimental sont présentés dans le tableau II-2.

Tableau II‑ : Équipements utilisés

|  |  |
| --- | --- |
| Désignation | Marque |
| Chaine HPLC | Waters alliance 2998 |
| Balance analytique | MS METTLER TOLEDO |
| Agitateur magnétique | Stirrer SB 161-3 |
| Bain a ultrason | FALC |
| pH-mètre | METTLER TOLEDO |
| Spectrophotomètre UV-visible | Perkin Elmer Lambda 25 |
| Appareil de désagrégation | Pharmatest-PTZ |

## II.3. Optimisation de la méthode de dosage

L’objectif principal de cette étude est d’optimiser une méthode de dosage simultané de la Spiramycine et du Métronidazole par la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sous la forme pharmaceutique étudiée. Pour ceci, nous avons effectué une recherche bibliographique et nous avons adopté les paramètres suivants : la colonne chromatographique, le débit et la température, alors que la phase mobile, le pH la phase mobile et la longueur d’onde de détection ont été optimisés. [35] Les conditions chromatographiques sont fixées dans le tableau II-3.

Tableau II‑ : Conditions chromatographiques

|  |  |
| --- | --- |
| Colonne | * SunFire, C18 * Longueur : 250 mm * Taille des particules : 5 μm * Diamètre intérieur : 4,6 mm |
| Débit | 1 mL/min |
| Température | 25°C |
| Longueur d'onde | 242 nm |
| Phase mobile | Solution tampon phosphate de pH=2,8/Acétonitrile : (70% / 30%) |
| Type d’élution | Mode isocratique |
| Solvant de dilution | Eau/Acétonitrile |
| Volume injecté | 20 µl |
| Durée d’analyse | 10 min |

## II.4. Validation analytique de la méthode de dosage des principes actifs de Bi-spirogyl

Nous visons à partir de ce protocole à doser simultanément la Spiramycine et le Métronidazole dans le produit fini par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

### II.4.1. Préparation des solutions

#### II.4.1.1. Préparation de la solution tampon

Pour préparer la solution tamponnée, on introduit dans une fiole jaugée de 1L une masse égale à 6,8 g de phosphate de potassium monobasique (KH2PO4-0,05 mol/L) et on ajuste par l'eau distillée tout en agitant sur un agitateur magnétique. Ensuite, on ajoute la solution en fixant le pH à une valeur égale à 2,8 à l'aide de l'acide ortho-phosphorique (85%) (H3PO4) dilué.

#### II.4.1.2. Préparation de la phase mobile

La phase mobile est un mélange (70 :30 ; v/v) d'une solution tampon de phosphate de potassium monobasique (KH2PO4-0,05 mol/L) ajustée à un pH= 2,8 et d'acétonitrile. Pour préparer une solution de 1L de la phase mobile, nous mélangeons 700 mL de la solution tampon et 300 mL d’acétonitrile et nous la mettons dans l’ultrason pendant 10 min. Puis, nous effectuons une filtration sous vide sur des papiers filtres de porosité 0,45 µm.

#### II.4.1.3. Préparation de diluant

Un mélange de 700 mL d'eau distillée et 300 mL d’acétonitrile.

#### II.4.1.4. Préparation du témoin

À l’aide d’une balance de précision, on pèse 150 mg de Spiramycine et 250 mg du Métronidazole et on les introduits dans une fiole jaugée de 100 mL .Après la dissolution dans le solvant de dilution, on ajuste au trait de jauge avec le même solvant. À la suite d’une agitation magnétique, on prélève 1 mL dans une fiole jaugée de 100 mL et on ajuste par le diluant.

#### II.4.1.5. Préparation d’essai

Dans une fiole jaugée de 100 mL, on introduit une quantité exactement pesée de 828 mg du comprimé « Bi-spirogyl ». On la dissout dans le solvant de dilution et on complète jusqu’au trait de jauge avec le même solvant puis on la met sous agitation magnétique. Une fois agitée, on filtre par un filtre pour seringue type (Sartorius 0,45 µm) puis on prélève 1 mL de cette solution et on l’introduit dans 100 mL du solvant de dilution.

#### II.4.1.6. Préparation du placébo

Le placébo (ou matrice) est un mélange comprenant tous les composants présents dans la forme pharmaceutique à l’exception des substances à analyser. La préparation du placébo consiste à peser chaque constituant qui le forme dans le respect des quantités inscrites, de rassembler toutes les prises d’essai dans un récipient approprié, notamment un flacon et de procéder à un bon mélange, en évitant tout risque de perte de manière à obtenir une poudre bien homogène qui constitue le « placébo ».

* **Préparation de la solution placébo**

On pèse exactement 428 mg de placébo. Par la suite, on dissout cette quantité dans le solvant de dilution dans une fiole jaugée de 100 mL et on soumet le mélange à une agitation magnétique. Ensuite, on filtre le mélange par un filtre pour seringue type (Sartorius 0,45 µm) puis on effectue la dilution de 1 dans 100.

#### II.4.1.7. Préparation de la FPR

La préparation de la forme pharmaceutique reconstituée se fait par ajout d’une quantité exactement pesée de principe actif à une quantité donnée exactement pesée de placébo, de manière à obtenir un mélange dans lequel le principe actif soit à une certaine proportion par rapport à sa proportion normale indiquée dans la composition du comprimé. Dans notre cas précis, le poids d’un comprimé est d’environ 828 mg donc il peut être défini comme un mélange de 428 mg de placébo avec 400 mg de principes actifs. Cette proportion est par conséquent considérée comme la proportion 100%, c’est donc la FPR 100%.

* **Préparation de la solution FPR**

Dans une fiole de 100 mL, on introduit 150 mg de Spiramycine, 250 mg du Métronidazole et 428 mg de placébo. On complète au trait de jauge avec du solvant et on soumet le mélange à une agitation magnétique. Ensuite, on filtre le mélange par un filtre pour seringue type (Sartorius 0,45 µm) puis nous effectuons la dilution de 1 dans 100.

### II.4.2. Étude de la spécificité

Afin de montrer la spécificité de la méthode, nous avons soumis à la technique d'analyse chromatographique les solutions suivantes : phase mobile, placébo, principes actifs seuls à 100%, principes actifs dans la forme pharmaceutique reconstituée à 100%. Ces solutions ainsi préparées seront injectées dans les conditions chromatographiques adoptées.

### II.4.3. Étude de la linéarité

La linéarité est étudiée sur un intervalle de mesure couvert par une série de cinq concentrations allant de 40 % à 120 % de la concentration théorique de dosage et sur la forme pharmaceutique reconstituée pour une gamme de concentration allant de 40 à 120 %, l’opération est à répéter pendant trois jours consécutifs. Avant l'injection des solutions, la colonne était équilibrée pendant au moins 20 min avec la phase mobile.

#### II.4.3.1. Linéarité des principes actifs seuls

Dans des fioles jaugées de 100 mL, nous introduisons les quantités en principes actifs présentées dans le tableau II-4.

Tableau II‑ : Étude de la linéarité des principes actifs seuls

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Échantillon | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 |
| Teneur en PA (%) | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Prise d’essai de Spiramycine (mg) | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 |
| Prise d’essai de Métronidazole (mg) | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 |

#### 

#### II.4.3.2. Linéarité de la FPR

Nous suivons la même démarche de préparation de la gamme principes actifs seuls, tout en ajoutant à chaque solution une quantité la plus constante possible en mélange placébo préparé précédemment environ 428 mg. Les quantités sont présentées dans le tableau II-5.

Tableau II‑ : Étude de la linéarité de la FPR

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Échantillon | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 |
| Teneur en PA (%) | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Prise d’essai de Spiramycine (mg) | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 |
| Prise d’essai de Métronidazole (mg) | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 |
| Placébo (mg) | 428 | 428 | 428 | 428 | 428 |

* Nous évaluons la linéarité par l'examen d'une courbe des valeurs de signal analytique, en fait à chacune des concentrations Xi correspond une surface Yi qui va former une droite de régression linéaire d’équation y = bx + a.
* Le coefficient de corrélation r doit être supérieur à 0.99.

### II.4.4. Étude de la fidélité

La fidélité est déterminée par l’étude de la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

#### II.4.4.1. La répétabilité

Pour la répétabilité le travail sera effectué sur une solution de concentration 100 % en Spiramycine et en Métronidazole injectée 6 fois dans le même jour, par le même opérateur et dans les mêmes conditions expérimentales.

#### II.4.4.2. La fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été évaluée sur trois jours en injectant 6 fois pendant chaque jour une solution de concentration 100 % en Spiramycine et en Métronidazole.

### II.4.5. Étude de l'exactitude

Selon l’ICH, l’exactitude est déterminée quand la spécificité, la linéarité et la fidélité ont été établies. Elle se calcule à partir des résultats des essais réalisés sur la FPR en effectuant trois mesures pour chaque niveau de concentration (40 à 120 %) à raison d’une mesure par jour. Le protocole expérimental est le même décrit dans le paragraphe de la linéarité de la FPR. Donc à partir des résultats obtenus nous calculons la quantité retrouvée puis nous déterminons le taux de recouvrement qui représente en pourcentage l’écart entre la quantité introduite et celle retrouvée.

### II.4.6. Limite de détection (LD) et de quantification (LQ)

Les limites de détection et de quantification sont déterminées à partir des dilutions successives d’une solution mère contenant les deux principes actifs : La Spiramycine et le Métronidazole. La solution mère est préparée en suivant le protocole expérimental développé dans le paragraphe, II.4.1.4. Préparation du témoin, du chapitre courant. À partir de la solution mère, nous préparons la gamme de dilution suivante :

* **Solution S0 :** On prélève 1 mL de la solution mère et on complète à 20 mL avec le solvant de dilution.
* **Solution S1 :** On prélève 1 mL de la solution mère et on complète à 50 mL avec le solvant de dilution.
* **Solution S2 :** On prélève 0,5 mL de la solution mère et on complète à 20 mL avec le solvant de dilution.

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été calculées en utilisant les formules suivantes :

****

Avec :

HBF : Hauteur du bruit de fond mesurée à partir de la réponse de la phase mobile. R : Facteur de réponse quantité/signal.



Où :

C : La plus petite quantité détectée. : Hauteur maximale du pic correspondant.

### II.4.7. Étude statistique des données

#### II.4.7.1. Linéarité

##### II.4.7.1.1. Test d’homogénéité des variances : Test de Cochran

###### Principe de la méthode

Ce test permet de vérifier si l'ensemble des données ou groupe de point contiennent des mesures aberrantes ou suspectes. Le principe de ce test est décrit selon les étapes suivantes :

1. Calculer la variance Si2 pour chaque groupe de point et on en déduit la somme des variances.
2. Trier les valeurs des variances Si2 par ordre croissant et chercher S2max.
3. Calculer le rapport C (α ; p ; n-1) donnée par la relation suivante :



1. Lire les valeurs limites critiques de la table de Cochran aux risques α=1% et α=5%, CCritique (α=1%) et Ccritique (α=5%), C (α, p, n).
2. Comparer CCalculée et CCritique.

###### Règles de décision

* Si **CCalculée > CCritique** au risque d'erreur, α=1%, le groupe de point est considéré comme aberrant et le test est significatif. Dans ce cas le Test de Dixon est nécessaire pour le groupe de point considéré (déterminer les points aberrants, les supprimés et refaire le test).
* Si **CCalculée > CCritique** au risque d'erreur, α=5%, le groupe de point est considéré comme suspect et le test est significatif.
* Si **CCalculée < CCritique** au risque d’erreur, α=1%, et **CCalculée < CCritique** au risque d’erreur, α=5%, alors les données ne contiennent pas un groupe de points aberrants.

##### II.4.7.1.2. Tests de Student

###### Test de comparaison des ordonnées à l’origine des droites de régression avec zéro

###### Principe de la méthode

Ce test permet de déterminer si la différence est significative entre la valeur de l’ordonnée à l’origine et zéro. Donc pour vérifier ce test il faut :

1. Calculer le critère tcalculée qui est une loi de Student dont le risque d'erreur α est pris égal à 1% et à N-2 degré de liberté, donnée par la relation suivante :



1. Lire la valeur critique de la table de Student au risqueα=1%, tcritique, t (α, N-2).
2. Comparer tcalculée ettcritique.

###### Règles de décision

* Si **tcalculée ≤ tcritique** lue dans la table de Student au risque d’erreur, α=1%, avec N-2 degré de liberté, il est possible de conclure que l’ordonnée à l’origine n’est pas différente de 0, c’est-à-dire il est équivalent à 0.
* Si **tcalculée > tcritique** lue dans la table de Student au risque d'erreur, α=1%, avec N-2 degré de liberté, il est possible de conclure que l’ordonnée à l’origine est différente de 0.

###### Test de comparaison des ordonnées à l'origine et des pentes des droites de régression

###### Principe de la méthode

Ce test permet de vérifier si les droites de régression du principe actif et de la forme pharmaceutique reconstituée sont superposées.

* Pour la comparaison des ordonnées à l’origine a1 et a2 des deux droites Di et Dj, nous effectuons un test de Student, donc il faut :

1. Calculer le critère ta qui est une loi de Student dont le risque d'erreur α est pris égal à 1% et à N1+N2-4 degré de liberté, donnée par la relation suivante :



1. Lire la valeur critique de la table de Student au risqueα=1%, tcritique, t (α, N1+N2-4).
2. Comparer ta ettcritique.

* Pour la comparaison des pentes b1 et b2 des deux droites Di et Dj, nous effectuons un test de Student, donc il faut :

1. Calculer le critère tb qui est une loi de Student dont le risque d'erreur α est pris égal à 1% et à N1+N2-4 degré de liberté, donnée par la relation suivante :



1. Lire la valeur critique de la table de Student au risqueα=1%, tcritique, t (α, N1+N2-4).
2. Comparer tb ettcritique.

###### Règles de décision

* Pour la comparaison des ordonnées à l’origine des droites Di et Dj :
* Si **ta ˂ tcritique** lue dans la table de Student au risque d'erreur, α=1%, avec N1+N2-4 degré de liberté, alors les deux ordonnées à l’origine ne sont pas significativement différentes (test non significatif).
* Si **ta > tcritique** lue dans la table de Student au risque d’erreur, α=1% avec N1+N2-4 degré de liberté, alors les deux ordonnées à l’origine sont significativement différentes (test significatif).
* Pour la comparaison des pentes des droites Di et Dj:
* Si **tb ˂ tcritique** lue dans la table de Student au risque d'erreur, α=1%, avec N1+N2-4 degré de liberté, alors les deux pentes ne sont pas significativement différentes (test non significatif).
* Si **tb > tcritique** lue dans la table de Student au risque d'erreur, α=1%, avec N1+N2-4 degré de liberté, alors les deux pentes sont significativement différentes (test significatif).

##### II.4.7.1.3. Test de Fisher : Test de l'existence d'une pente significative

###### Principe de la méthode

Le test de l'existence d'une pente significative consiste à comparer les variations dues à la régression et celles dues aux erreurs expérimentales et aux erreurs d'ajustement. Pour cela, il faut prouver que la pente de la droite, n'est pas seulement due à la variance résiduelle, mais que la droite possède une pente qui lui est propre et pour vérifier ce test il faut :

1. Calculer**,**la variance due à la régression linéaire.
2. Calculer**,**la variance résiduelle, qui représente la différence entre la valeur théorique et la valeur réelle.
3. Calculer le critère F1qui est une loi de Fisher donnée par la relation suivante :



1. Lire la valeur critique de la table de Fisher au risqueα=1%, Fcritique, F (α, 1, N-2).
2. Comparer F1 et Fcritique.

###### Règle de décision

* Si **F1 > Fcritique** lue dans la table de Fisher au risque d'erreur, α=1%, avec 1 degré de liberté de la variation due à la régression linéaire et N-2 degré de liberté de la variance résiduelle, il est possible de conclure l’existence d’une pente significative.
* Si **F1 ≤ Fcritique** lue dans la table de Fisher au risque d’erreur, α=1%, avec 1 degré de liberté de la variation due à la régression linéaire et N-2 degré de liberté de la variance résiduelle, il est possible de conclure qu'il n'y a pas dépendance linéaire.

#### II.4.7.2. Fidélité

##### II.4.7.2.1. Test d’homogénéité des variances : Test de Cochran

Avant de procéder au calcul de la fidélité intermédiaire, il faut appliquer le test de Cochran.

##### II.4.7.2.2. Évaluation de la fidélité

La fidélité est déterminée par l’étude de la répétabilité et fidélité intermédiaire qui sont évaluées à l’aide du coefficient de variation de répétabilité CVr et de fidélité intermédiaire CVRsur les 6 injections de la solution de concentration 100 %.

* Si le coefficient de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire est inférieur à 5%, nous pouvons conclure que la méthode est fidèle.

#### II.4.7.3. L’exactitude

##### II.4.7.3.1. Calcul des recouvrements

Il est tout d’abord nécessaire de calculer le taux de recouvrement pour chaque quantité trouvée en considérant comme système de référence la solution étalon 100% en appliquant cette formule : 

Avec :

 : La réponse observée  : La concentration en principe actif  : La concentration de la solution étalon 100%  : La réponse observée pour solution étalon 100% en considérant la réponse moyenne des trois jours.

* La méthode est exacte, si  est compris entre [95%-105%].

##### II.4.7.3.2. Test d’homogénéité des variances : Test de Cochran

Nous vérifions l’homogénéité des variances des recouvrements par l'utilisation de test de Cochran.

##### II.4.7.3.3. Test de validité des moyennes

###### Principe de la méthode

Ce test consiste à prouver que les moyennes des taux de recouvrement retrouvés sont homogènes, c'est-à-dire qu’elles varient peu d’un groupe à un autre en comparant la variance intergroupe et la variance intragroupe et pour vérifier ce test il faut :

1. Calculer la variance intergroupe.
2. Calculer la variance intragroupe.
3. Calculer le critère F3 qui illustre la cohérence entre la variance intergroupe et la variance intragroupe donnée par la relation suivante :



1. Lire la valeur critique de la table de Fisher au risque α=1%, Fcritique, F (α, p-1, N-p).
2. Comparer F2 et Fcritique.

###### Règle de décision

* Si **F2 < Fcritique** lue dans la table de Fisher au risque d’erreur, α=1%, avec p-1 degré de liberté de la variation intergroupe et N-p degré de liberté de la variance intragroupe, nous déclarerons que les moyennes sont homogènes
* Si **F2 >Fcritique** lue dans la table de Fisher au risque d'erreur, α=1%, avec p-1 degré de liberté de la variation intergroupe et N-p degré de liberté de la variance intragroupe, nous déclarerons que les moyennes sont non homogènes.

##### II.4.7.3.4. Estimation de recouvrement moyen

Après la validation des taux de recouvrement par un test de Cochran pour les variances, il est possible de déterminer le recouvrement moyen ainsi que son intervalle de confiance qui est donné par les relations suivantes :

* **Recouvrement moyen** 



## II.5. Application : Dosage du médicament étudié : « Bi-spirogyl »

Pour la vérification de la méthode de dosage, nous avons procédé à son application pour le dosage de la Spiramycine et du Métronidazole dans la forme pharmaceutique étudiée . La teneur en principe actif (mg/comprimé) est déterminée par l’expression suivante :



Avec :

 : Prise d’essai témoin en mg.  : Aire du pic essai .  : Aire du pic témoin.  : Prise d’essai en mg.  : Poids moyen d’un comprimé de Bi-spirogyl.

* La teneur en Spiramycine doit être comprise entre 135 et 165 mg/Cp de Bi-spirogyl.
* La teneur en Métronidazole doit être comprise entre 225 et 275 mg/Cp de Bi-spirogyl.

## II.6. Étude de la stabilité du médicament étudié : « Bi-spirogyl »

Un médicament est considéré comme stable lorsque ses propriétés essentielles ne changent pas ou changent au plus dans des proportions tolérables jusqu’à sa date de péremption. Nous étudiions la stabilité de ce médicament dans les conditions suivantes :

* Conditions en temps réel : 25°C-60% HR. Les études à 25°C sont couramment réalisées pour une durée de 12 mois.
* Conditions accélérées : 40°C-75% HR. Ces études sont réalisées en exposant le médicament à 40°C dans une enceinte thermique. Ils sont couramment réalisés pour une durée de 6 mois.

Nous proposons quelques tests à différents temps, pendant toute la durée de stockage afin de déterminer la conformité du produit fini selon la Pharmacopée Européenne. Parmi ses tests, nous pouvons citer :

### II.6.1. Contrôle d’aspect du produit fini

La forme pharmaceutique étudiée, elle s’agit d’un comprimé pelliculé, rond, lisse, à face bombée, de couleur rose, sans gravure et d’environ 13,5 mm de diamètre.

### II.6.2. Masse moyenne

Nous réalisons un contrôle de masse moyenne sur 20 comprimés prélevés au hasard qui par la suite sont pesés individuellement. La masse moyenne d’un comprimé doit être de 786,6 mg à 869,4 mg.

### II.6.3. Essai de désagrégation

Ce test est réalisé sur 6 comprimés pelliculés dans l’eau purifiée à 37°C à l’appareil Pharma test-PTZ. Pour l’essai, nous plaçons un comprimé et un disque dans chaque tube, Au bout de 30 min, il ne doit rester aucun résidu sur les grilles. S’il reste une masse molle, nous vérifions que celle-ci ne comporte pas de noyau dur. Le temps de désagrégation doit être inférieur ou égal à 30 min.

### II.6.4. Dosage

Pour étudier la stabilité du produit fini, il faut montrer qu’il ne se dégrade pas pendant la durée du stockage quel que soit les conditions étudiées (en temps réel ou accéléré). Nous devons donc suivre l’évolution des teneurs en principes actifs au cours du temps et analyser la stabilité tout en évaluant l’influence de différents paramètres (température, humidité, etc.) sur la stabilité de la molécule. Donc si les résultats obtenus sont non conformes, l’hypothèse de stocker ce médicament dans ces conditions étudiées sera rejetée. Pour doser les substances actives, le protocole expérimental est le même décrit dans le paragraphe, II.4.1.6. Préparation d’essai, du chapitre courant.

* La teneur en Spiramycine doit être comprise entre 135 et 165 mg/Cp de Bi-spirogyl.
* La teneur en Métronidazole doit être comprise entre 225 et 275 mg/Cp de Bi-spirogyl.

## Conclusion

En conclusion, ce chapitre nous a permis de mettre en avant les différentes méthodes et matériels nécessaires à la réalisation de notre travail : optimisation, validation, dosage et étude de stabilité. Ce processus est rigoureusement contrôlé par la Pharmacopée Européenne afin de démontrer que la méthode mise en œuvre par le laboratoire est apte à l’emploi prévu. Cette étape est essentielle pour l’application des méthodes qui constitue l’objet du chapitre suivant.

# 

# Résultats et discussion

## Introduction

Ce chapitre est décomposé en trois sections importantes. Tout d’abord, une optimisation de la méthode de dosage, afin de tirer les conditions chromatographiques optimales, et par la suite la validation de cette méthode d’analyse. Et enfin, une analyse des effets de la température et de l’humidité, sur les caractéristiques pharmaco-techniques du comprimé.

## III.1. Optimisation de la méthode de dosage

### III.1.1. Choix de la longueur d’onde de détection

La longueur d’onde doit être spécifique du composé à analyser et avoir une absorbance suffisante afin d’avoir une aire du pic satisfaisante. L’analyse des spectres UV des solutions de la Spiramycine et du Métronidazole à une concentration de 4 µg/mL chacune montre que le maximum d’absorption de ces composés est situé à une longueur d’onde de 231,52 nm et 316,23 nm comme le montre la figure III-1.

* Nous avons choisi, 242 nm comme valeur de la longueur d’onde de détection qui peut être utilisée pour le dosage simultané de ces deux principes actifs.

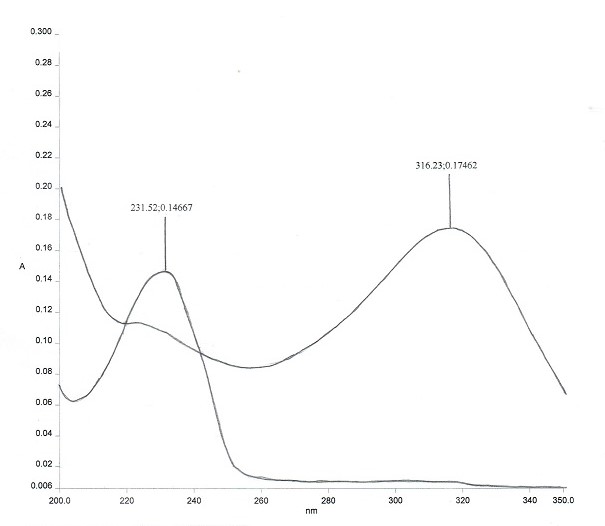


Figure III‑ : Spectre UV du PA1 et PA2

### III.1.2. Choix de la phase mobile

La variation de la phase mobile sur la rétention des deux principes actifs a donné les enregistrements chromatographiques représentés par la figure A-1, (voir Annexe A). En effet, le changement du solvant organique dans la composition de la phase mobile induit une élution plus rapide de la Spiramycine et du Métronidazole.

* Donc, on choisit une phase mobile de composition (30/70 ; v/v) en acétonitrile-tampon phosphate de pH=2,4.

### III.1.3. Choix du pH de la phase mobile

Après avoir choisi la phase stationnaire et la phase mobile, nous étudions l’influence du pH du tampon phosphate sur la résolution des pics chromatographiques, en faisant varier le pH entre 2 et 3,2. Bien évidemment, cette étude sera effectuée en utilisant une colonne Sunfire RP-18, une phase mobile de composition (30/70 ; v/v) en acétonitrile-tampon phosphate (0,05M-pH0=4,62), un débit égale à 1mL/min et à 25°C. La variation de la résolution des pics en fonction du pH est illustrée par la figure III-2.

Figure III‑ : Variation de la résolution des pics en fonction du pH

* Le résultat de la figure III-2 permet de constater une augmentation remarquable de la résolution des pics jusqu’à un pH égal à 2,8. Par contre au-delà de ce pH, la résolution commence à diminuer. L’injection du mélange dans cette gamme de pH (2 ; 2,2 ; 2,6 ; 2,8 ; 3 et 3,2) montre que, pH égal à 2,8 est la valeur optimale.

## III.2. Validation analytique de la méthode de dosage des principes actifs de Bi-spirogyl

### III.2.1. Spécificité

La spécificité d’une méthode d’analyse consiste à montrer que le pic mesuré ne provient que du composé à analyser, sans aucune interférence avec sa matrice (excipients, produits de dégradation, impuretés, etc.). Nous injectons les solutions déjà mentionnées dans le protocole expérimental et les résultats sont illustrés dans le tableau III-1.

Tableau III‑ : Étude de la spécificité

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Paramètres** | **PA1** | | **PA2** | |
| **PAS** | **FPR** | **PAS** | **FPR** |
| **Temps de rétention  (min)** | 2,421 | 2,457 | 2,883 | 2,874 |
| **Airs des pics** | 271816,67 | 259329,33 | 441065,33 | 431992,00 |

* Nous constatons à partir des chromatogrammes en Annexe A, (Figure A-3) et le tableau III-1, qu’aucun composé n'interfère avec les deux principes actifs. Par conséquent, le signal relatif aux deux principes actifs mesuré dans la forme pharmaceutique reconstituée provient uniquement de ces deux principes actifs.
* Nous pouvons conclure que cette méthode choisie est spécifique pour le dosage simultané de ces deux principes actifs.

### III.2.2. Limite de détection et de quantification

Le test de spécificité a montré que la méthode est spécifique pour le dosage simultané de ces deux principes actifs. Nous devons alors vérifier que cette méthode est capable de détecter et de quantifier les traces de ces derniers donc nous devons déterminer leurs limites de détection et de quantification. La solution mère et les différentes solutions diluées sont injectées dans les conditions chromatographiques adoptées. Nous obtenons donc les résultats suivants, présentés dans le tableau III-2.

Tableau III‑ : Interprétations des chromatogrammes

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Solution | Teneur en PA (ppm) | | Interprétations |
| **PA1** | **PA2** |
| S |  |  | Pic détectable et quantifiable |
| S1/20 |  |  | Pic détectable et quantifiable |
| S0, 5/20 |  |  | Pic détectable et non quantifiable |
| S1/50 |  |  | Pic non détectable et non quantifiable |

La détermination des limites de détection et de quantification est obtenue comme suit : À partir du chromatogramme correspondant à la solution **S0, 5/20**, nous déterminons les limites de détection, et à partir du chromatogramme correspondant à la solution **S1/20**, nous déterminons les limites de quantification, en estimant la hauteur du bruit de fond HBF et la hauteur du pic hmax, comme le montre les tableaux III-3 et III-4.

Tableau III‑: Détermination des LD et LQ du PA1

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Solution | Teneur en PA (ppm) | HBF (cm) | hmax (cm) | R (ppm/cm) | LD (ppm) | LQ (ppm) |
| S0, 5/20 |  | 0,25 | 0,9 |  |  | - |
| S1/20 |  | 0,16 | 1,7 |  | - |  |

Tableau III‑ : Détermination des LD et LQ du PA2

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Solution | Teneur en PA (ppm) | HBF (cm) | hmax (cm) | R (ppm/cm) | LD (ppm) | LQ (ppm) |
| S0, 5/20 |  | 0,48 | 1,62 |  |  | - |
| S1/20 |  | 0,24 | 2,60 |  | - |  |

* La méthode analytique adoptée permet la détection de quantités supérieures ou égales à 3,13.10-4 ppm et la quantification de quantités supérieures ou égales à 7,06.10-4 ppm pour la Spiramycine.
* La méthode analytique adoptée permet la détection de quantités supérieures ou égales à 5,55.10-4 ppm et la quantification de quantités supérieures ou égales à 11,52.10-4 ppm pour le Métronidazole.

### III.2.3. Linéarité

La linéarité de la méthode permet de démontrer sa capacité d’obtenir des résultats directement proportionnels aux concentrations de la Spiramycine et du Métronidazole á l’intérieur de l’intervalle de mesure choisi (40%, 60%, 80% ; 100%, 120%).

#### III.2.3.1. Linéarité des principes actifs seuls

Les tableaux III-5 et III-6 regroupent les réponses correspondantes à chaque concentration pour les trois jours séparément, lors de l'étude de la linéarité pour les deux principes actifs seuls. Les résultats illustrés dans les tableaux peuvent être représentés sous forme de droites de régression déterminées en fonction de la surface des pics obtenus et de la teneur en principe actif d'équation y=b x + a. Les résultats du test de linéarité pour la Spiramycine seule sont regroupés dans le tableau III-5.

Tableau III‑: Résultats de l’étude de la linéarité du PA1 seul

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA1 (%) | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Concentration (mg/mL) |  |  |  |  |  |
| Moyenne des surfaces | 105412,67 | 167786,67 | 211600,33 | 271816,67 | 303911,67 |

Les résultats du tableau III-5 permettent de tracer la courbe représentée dans la figure III-3.

Figure III‑ : Courbe de linéarité du PA1 seul

Les résultats du test de linéarité pour le Métronidazole seul sont regroupés dans le tableau III-6.

Tableau III‑: Résultats de l’étude de la linéarité du PA2 seul

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA2 (%) | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Concentration (mg/mL) |  |  |  |  |  |
| Moyenne des surfaces | 169095,33 | 278741,00 | 342810,33 | 441065,33 | 494580,00 |

Les résultats du tableau III-6 permettent de tracer la courbe représentée dans la figure III-4.

Figure III‑ : Courbe de linéarité du PA2 seul

#### III.2.3.2. Linéarité de la forme pharmaceutique reconstituée

Les tableaux III-7 et III-8 regroupent les résultats obtenus lors de l'étude de la linéarité pour les deux principes actifs dans la forme pharmaceutique reconstituée. Les résultats de l’étude de la linéarité de la Spiramycine dans la FPR sont regroupés dans le tableau III-7.

Tableau III‑: Résultats de l’étude de la linéarité du PA1 dans la FPR

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA1 (%) | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Concentration (mg/mL) |  |  |  |  |  |
| Moyenne des surfaces | 105791,67 | 156051,67 | 211996,00 | 261662,67 | 312382,33 |

Les résultats du tableau III-7 permettent de tracer la courbe représentée dans la figure III-5.

Figure III‑ : Courbe de linéarité du PA1 dans la FPR

Le tableau III-8 regroupe les résultats obtenus lors de l’étude de linéarité pour le Métronidazole dans la FPR.

Tableau III‑ Résultats de l’étude de la linéarité du PA2 dans la FPR

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA2 (%) | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Concentration (mg/mL) |  |  |  |  |  |
| Moyenne des aires | 169692,0 | 254572,67 | 342317,00 | 431992,00 | 511796,33 |

La droite de régression du Métronidazole est représentée dans la figure III-6.

Figure III‑ : Courbe de linéarité du PA2 dans la FPR

#### III.2.3.3. Estimation des droites de régression

Les critères de la droite de régression : le coefficient de corrélation, la pente et l’ordonnée à l’origine ont été déterminés et regroupés dans les tableaux III-9 et III-10.

Tableau III‑: Estimation des droites de régression pour les PAS

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres | PA1 | PA2 |
| Pente de la droite (b) | 16700933,33 | 16265873,40 |
| Ordonnée à l'origine (a) | 11694,40 | 19940,93 |
| Coefficient de corrélation (r) | 0,995 | 0,994 |
| Équation de la droite de régression (y) | y = 2.107 x + 11694 | y = 2.107 x + 19941 |

Tableau III‑: Estimation des droites de régression pour les FPR

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres | PA1 | PA2 |
| Pente de la droite (b) | 17293077,33 | 17232559,8 |
| Ordonnée à l'origine (a) | 2259,94 | 2577,20 |
| Coefficient de corrélation (r) | 0,999 | 0,999 |
| Équation de la droite de régression (y) | y = 2.107 x +2259,94 | y = 2.107 x -2577,2 |

* Les coefficients de corrélation des droites de régression correspondants aux principes actifs seuls et dans la forme pharmaceutique reconstituée sont supérieurs à 0,99.
* Nous pouvons donc conclure, que la méthode de dosage de ces deux principes actifs par HPLC est linéaire à l’intérieur de l’intervalle de dosage choisi. Celle-ci doit être vérifiée par les tests statistiques de Cochran, Student et Fisher.

#### III.2.3.4. Test d'homogénéité des variances : Test de Cochran

Nous avons reporté dans le tableau III-11, les résultats du ''Test de Cochran'' pour les deux principes actifs seuls et dans la forme pharmaceutique reconstituée.

Tableau III‑: Résultat du test de Cochran

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Paramètres** | **PA1** | | **PA2** | |
| **PAS** | **FPR** | **PAS** | **FPR** |
| **Ccalculé** | 0,334 | 0,681 | 0,607 | 0,602 |
| **Ccritique (0,05 ; 5 ; 2)** | 0,684 | | | |
| **Ccritique (0,01 ; 5 ; 2)** | 0,788 | | | |

D’après le test de Cochran, nous remarquons que pour les deux gammes :

* **Ccalculé < Ccritique (0,05 ; 5 ; 2)**, donc il n’existe pas de points suspects au risque α=5%.
* **Ccalculé < Ccritique (0,01 ; 5 ; 2)**, donc il n’existe pas de points aberrants au risque α=1%.

Ainsi, l’ensemble des variances des différents groupes pour les deux gammes peut être considéré comme homogène.

#### III.2.3.5. Tests de Student

##### III.2.3.5.1. Test de comparaison des ordonnées à l’origine des droites de régression avec zéro

Il s’agit d’appliquer le test de Student sur les droites de régression relatives aux deux gammes. Les résultats des calculs statistiques du test de comparaison de l’ordonnée à l’origine des droites de régression avec zéro pour les deux principes actifs seuls et dans la forme pharmaceutique reconstituée (FPR) sont résumés dans le tableau III-12.

Tableau III‑ : Résultats du test de comparaison des ordonnées à l’origine

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Paramètres** | **PA1** | | **PA2** | |
| **PAS** | **FPR** | **PAS** | **FPR** |
| **tcalculé** | 2,114 | 1,620 | 1,975 | 1,510 |
| **t(0,01 ; 13)** | 3,012 | | | |

* D’après les résultats trouvés, nous constatons pour les deux gammes que : **tcalculé < t(0,01 ; 13)**, ce qui nous permettons de dire que les deux ordonnées à l’origine ne sont pas significativement différentes de zéro au risque α=1%.

##### III.2.3.5.2. Test de comparaison des ordonnées à l'origine et des pentes des droites de régression

Un test de Student est utilisé pour comparer les pentes et les ordonnées à l’origine des droites de régression. Les résultats sont affichés dans le tableau III-13.

Tableau III‑ : Résultats du test de comparaison des ordonnées à l'origine et des pentes des droites de régression

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres | D1 et D3 | D2 et D4 |
|  | 1,654 | 1,696 |
|  | 1,271 | 1,927 |
| t (0,01 ; 26) | 2,779 | |

* Pour la comparaison des ordonnées à l’origine pour les deux principes actifs, nous remarquons que **ta ˂ tcritique**,donc les ordonnées à l’origine des deux droites sont significativement les mêmes au risque définie. Nous pouvons donc conclure l’inexistence d’erreurs systématiques lors du dosage des principes actifs dans la FPR.
* Pour la comparaison des pentes pour les deux principes actifs, la valeur de **tb ˂ tcritique**, Nous affirmons donc que les pentes sont non significativement différentes au seuil défini. Nous pouvons conclure qu’il n’existe pas d’effet de matrice lors du dosage des principes actifs dans la FPR.

#### III.2.3.6. Tests de Fisher : Test de l'existence d'une pente significative

Les résultats du test de l'existence d'une pente significative pour les deux principes actifs seuls et dans la forme pharmaceutique reconstituée sont affichés dans le tableau III-14.

Tableau III‑ : Résultats du test de l'existence d'une pente significative

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Paramètres** | **PA1** | | **PA2** | |
| **PAS** | **FPR** | **PAS** | **FPR** |
| **Fcalculé** | 1324,57 | 20911,56 | 1009,34 | 29381,91 |
| **F (0,01 ; 1 ; 13)** | 9,07 | | | |

* Pour les deux principes actifs seuls ou dans la FPR en utilisant le test de Fisher, nous avons, **Fcalculé > F Critique.**Nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative.
* Après la vérification de tous les tests concernant la linéarité, nous pouvons conclure que la méthode est linéaire.

### III.2.4. Fidélité

#### III.2.4.1. Répétabilité

Le tableau III-15 présente les résultats de l’étude de la répétabilité.

Tableau III‑ : Résultat de l’étude de la répétabilité

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nombre d'essai | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Aires des pics | **PA1** | 266951 | 260258 | 274854 | 278751 | 260587 | 261452 |
| **PA2** | 423175 | 427377 | 420644 | 425379 | 423771 | 426075 |

#### III.2.4.2. Fidélité intermédiaire

Les tableaux III-16 et III-17 présentent les résultats de l’étude de la fidélité intermédiaire sur trois jours avec six préparations à raison d’une série par jour.

Tableau III‑ : Résultat de l’étude de la fidélité intermédiaire pour PA1

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nombre d'essai | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Aires des pics | **Jour1** | 264150 | 253302 | 265744 | 255440 | 262408 | 253249 |
| **Jour2** | 269898 | 272431 | 273121 | 272557 | 271842 | 271441 |
| **Jour3** | 266951 | 260258 | 274854 | 278751 | 260587 | 261452 |

Tableau III‑ : Résultat de l’étude de la fidélité intermédiaire pour PA2

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nombre d'essai | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Aires des pics | **Jour1** | 416349 | 417967 | 419750 | 417459 | 415388 | 416075 |
| **Jour2** | 437175 | 442377 | 443644 | 445379 | 443771 | 443834 |
| **Jour3** | 423175 | 427377 | 420644 | 425379 | 423771 | 426075 |

##### III.2.4.2.1. Test d'homogénéité des variances : Test de Cochran

Les résultats du ''Test de Cochran'' pour les deux principes actifs sont affichés dans le tableau III-18.

Tableau III‑ ; Résultat du test de Cochran

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres | PA1 | PA2 |
| Ccalculé | 0,653 | 0,500 |
| Ccritique (0,05 ; 3 ; 5) | 0,746 | |
| Ccritique (0,01 ; 3 ; 5) | 0,834 | |

* Pour les deux principes actifs, on a **Ccalculé < Ccritique** au risque α=1% et α=5%donc nous n'avons pas un groupe de point aberrant ce qui vérifie l’homogénéité des variances des séries de fidélité, donc le test de Cochran n'est pas significatif.

##### III.2.4.2.2. Évaluation de la fidélité

Les coefficients de variation de répétabilité CVr et de reproductibilité CVR sont affichés dans le tableau III-19.

Tableau III‑ : Coefficients de variation

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres | PA1 | PA2 |
| Coefficient de variation de répétabilité CVr (%) | 1,22 | 0,23 |
| Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire CVR(%) | 3,12 | 3,11 |

* Les coefficients de variation de répétabilité CVr et de reproductibilité CVR trouvés sont inférieurs à 5%, ce qui prouve que la fidélité de notre méthode analytique est satisfaisante. Donc nous pouvons dire que la méthode est répétable et reproductible.

### III.2.5. L’exactitude

#### III.2.5.1. Calcul des recouvrements

Les recouvrements des différents groupes trouvés sont rapportés dans le tableau III-20.

Tableau III‑ : Résultats du calcul des taux de recouvrement

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA(%) | | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Recouvrement yij(%) | **PA1** | 96,68  97,60  96,62 | 95,59  95,52  95,94 | 97,68  98,64  96,16 | 96,17  96,94  95,69 | 95,69  95,85  95,77 |
| **PA2** | 95,29  96,41  96,85 | 96,50  96,28  95,81 | 97,99  96,69  96,37 | 98,04  98,19  97,60 | 96,50  96,92  96,67 |

* Les taux de recouvrement sont compris dans l’intervalle [95%-105%], d’où les résultats sont jugés acceptables.

#### III.2.5.2. Test d'homogénéité des variances : Test de Cochran

Les résultats du ''Test de Cochran'' appliqué sur les variances des taux de recouvrement des différents groupes sont affichés dans le tableau III-21.

Tableau III‑ : Résultats du test de Cochran appliqué sur les variances des taux de recouvrement

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres | PA1 | PA2 |
| Ccalculé | 0,677 | 0,445 |
| Ccritique (0,05 ; 5 ; 2) | 0,746 | |
| Ccritique (0,01 ; 5 ; 2) | 0,834 | |

* Les variances des différents groupes peuvent être considérés homogènes aux risques considérés du fait que **Ccalculé < Ccritique (0,05 ; 5 ; 2)** et **Ccalculé < Ccritique (0,05 ; 5 ; 2)**.

#### III.2.5.3. Test de validité des moyennes

Les résultats du test de validité des moyennes sont affichés dans le tableau III-22.

Tableau III‑ : Résultats du test de validité des moyennes

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Paramètres** | **PA1** | **PA2** |
| **Fcalculé** | 4,69 | 4,79 |
| **F (0,01 ; 4 ; 10)** | 5,99 | |

* Nous avons, **Fcalculé > F Critique**, nous pouvons conclure que les variations des observations entre les différents groupes peuvent être considérées comme dues aux erreurs expérimentales, au risque considéré.

#### III.2.5.4. Estimation de l’intervalle de confiance

Les détails de calcul sont présentés dans le tableau III-23.

Tableau III‑ : Résultats d’estimation de l’intervalle de confiance

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Paramètres** | **Valeurs** | |
| **PA1** | **PA2** |
| **Recouvrement moyen (%)** | 96,50 | 96,81 |
| **Variance totale** | 0,94 | 0,69 |
| **t (0,01 ; 14)** | 2,977 | |
| **ICM (%)** | 96,50 ±0,24 % | 96,81±0,53% |

* Les recouvrements moyens sont compris dans les intervalles de confiance de la Spiramycine et du Métronidazole. Nous pouvons conclure que les tests statistiques menés à l’étude de l’exactitude sont conformes, donc la méthode de dosage des deux principes actifs est exacte.

## III.3. Application : Dosage du médicament étudié : « Bi-spirogyl »

Après avoir démontré tous les critères de la validation de la méthode de dosage de la Spiramycine et du Métronidazole par HPLC, nous avons procédé ensuite à son application sur la forme pharmaceutique étudiée. Les résultats de cette application sont regroupés dans les tableaux III-24.

Tableau III‑ : Teneurs en PA par comprimé

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Paramètres** | **PA1** | | **PA2** | |
| **ST** | **SE** | **ST** | **SE** |
| **Aires des pics** | 269898  272431  273121 | 275402  266497  270113 | 437175  442377  443644 | 440103  441112  439766 |
| **Moyenne des aires** | 271816,67 | 270337,33 | 441065,33 | 440327,00 |
| **Teneur en PA (mg/Cp)** | 149,18 | | 249,58 | |

* Nous avons obtenu une teneur en PA1 égale à 149,56 mg par comprimé de « Bi-spirogyl » et en PA2 une teneur égale à 242,81 mg par comprimé de « Bi-spirogyl ».
* En se référant à la teneur des principes actifs exigée par la Pharmacopée Européenne : de 135 à 165 mg de Spiramycine par comprimé de Bi-spirogyl et de 225 à 275 mg du Métronidazole par comprimé de « Bi-spirogyl ». Nous concluons, que la teneur calculée appartient à l’intervalle de conformité donné par la spécification exigée. Donc, le dosage des principes actifs est conforme.

## III.4. Étude de la stabilité du médicament étudié : « Bi-spirogyl »

### III.4.1. Étude de la stabilité en temps réel

Le tableau III-25 présente l’étude de la stabilité de « Bi-spirogyl » réalisée sur trois lots dans des conditions de stockage en temps réel.

Tableau III‑ : Étude de la stabilité de « Bi-spirogyl » en temps réel

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Détermination** | | **Aspect** | **Masse moyenne**  **(mg)** | **Essai de désagrégation (Min**) | **Dosage** | |
| **PA1** (**mg/Cp)** | **PA2 (mg/Cp)** |
| **Lot 1** | **T0** | Conforme | 829,64 | 6 | 157,3 | 244,75 |
| **T3 mois** | Conforme | 831,74 | 6 | 149,3 | 245,88 |
| **T6 mois** | Conforme | 828,35 | 6 | 151,1 | 245,09 |
| **Lot 2** | **T0** | Conforme | 830,62 | 7 | 158,9 | 250,39 |
| **T3 mois** | Conforme | 829,45 | 7 | 157,5 | 250,11 |
| **T6 mois** | Conforme | 832,62 | 8 | 158,1 | 250,89 |
| **Lot 3** | **T0** | Conforme | 812,20 | 4-9 | 152,6 | 246,9 |
| **T3 mois** | Conforme | 819,63 | 6 | 153,4 | 247,87 |
| **T6 mois** | Conforme | 817,40 | 5 | 151,8 | 245,62 |

* Le tableau III-25 montre que pour les trois lots étudiés, le médicament a conservé son aspect initial : comprimé pelliculé, lisse, de couleur rose, rond, sans gravure, à face bombée et de 13,5 mm de diamètre.
* Au niveau des trois lots étudiés, nous constatons que la masse moyenne de chaque comprimé ne dépasse pas les limites admises qui correspondent à une limite inférieure de 786,6 mg et à une limite supérieure de 869,4 mg. Ces deux limites correspondent à un écart de 5% de la masse moyenne. Ces résultats respectent les conditions d’acceptation de la Pharmacopée Européenne. Nous pouvons conclure que la production des comprimés pelliculés est très homogène.
* Le temps de désagrégation mesuré pour les trois lots, varie de 4 à 9 min. Donc il est conforme à la Pharmacopée qui indique un temps inférieur à 30 minutes.
* Les données issues de cette étude indiquent que les valeurs des teneurs en principes actifs (Spiramycine/ Métronidazole) mesurées en fonction du temps de conservation pour les conditions en temps réel restent dans les limites des normes exigées.

### III.4.2. Étude de la stabilité par dégradation accélérée

Le tableau III-26, résume les valeurs de l’étude de la stabilité de « Bi-spirogyl » réalisée sur trois lots dans des conditions de stockage accélérées.

Tableau III‑ : Étude de la stabilité de « Bi-spirogyl » par dégradation accélérée

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Détermination** | | **Aspect** | **Masse moyenne**  **(mg)** | **Essai de désagrégation (Min**) | **Dosage** | |
| **PA1** (**mg/Cp)** | **PA2 (mg/Cp)** |
| **Lot 1** | **T0** | Conforme | 829,64 | 6 | 157,3 | 244,75 |
| **T1 mois** | Conforme | 827,46 | 5 | 150 | 238,83 |
| **T2 mois** | Conforme | 831,74 | 6 | 143,8 | 233,52 |
| **T3 mois** | Conforme | 832,12 | 4 | 135,2 | 225,11 |
| **T4 mois** | Conforme | 828,35 | 6 | 134,9 | 224,88 |
| **Lot 2** | **T0** | Conforme | 830,62 | 7 | 158,9 | 250,39 |
| **T1 mois** | Conforme | 833,23 | 8 | 150,3 | 245,43 |
| **T2 mois** | Conforme | 829,44 | 7 | 146,2 | 236,12 |
| **T3 mois** | Conforme | 830 ,75 | 7 | 140,9 | 225,09 |
| **T4 mois** | Conforme | 832,72 | 8 | 134,8 | 224,98 |
| **Lot 3** | **T0** | Conforme | 812,20 | 4-9 | 152,6 | 246,9 |
| **T1 mois** | Conforme | 814,55 | 5 | 148,3 | 240,63 |
| **T2 mois** | Conforme | 813,63 | 4 | 143,4 | 234,42 |
| **T3 mois** | Conforme | 818,23 | 6 | 140,2 | 225,06 |
| **T4 mois** | Conforme | 817,40 | 5 | 134,9 | 224,95 |

* Après 3 mois de stockage à 40°C-75% HR, on constate que les résultats mettent en évidence une diminution des teneurs en principes actifs pour les trois lots étudiés. Nous pouvons voir que les teneurs calculées n'appartiennent pas à l’intervalle de conformité donné par la spécification exigée. Donc, il faut maîtriser les conditions de températures lors du stockage pour éviter la formation de produits de dégradation qui pourraient être potentiellement toxiques. (Voir Annexe B)
* Donc à titre de précaution, il est recommandé de conserver le médicament à une température ambiante (25°C).

## Conclusion

Tout le long de ce chapitre. Nous avons traité les différents résultats pratiques obtenus. Au début, nous avons justifié le choix des paramètres chromatographiques fixés dans le chapitre précèdent. Ensuite, nous avons conclu que les tests statistiques menés à l’étude de la linéarité, de la fidélité et d’exactitude sont conformes, d’où nous avons pu conclure que la méthode de dosage des deux principes actifs est valide. Puis nous procédons à son application sur le produit fini, pour pouvoir quantifier les teneurs de la Spiramycine et du Métronidazole. Finalement, nous avons déterminé les conditions de stockage du médicament étudié.

Conclusion générale

Le principe de la validation des procédures analytiques est, aujourd’hui largement, répandu dans tous les domaines d’activité où des mesures sont réalisées. Le champ d’application de la validation analytique s’étend à toute procédure d’analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. Donc, elle a pour but de démontrer qu’elles correspondent à l’utilisation pour laquelle elles sont proposées. Au terme de ce projet, nous avons pu élaborer dans un premier temps un protocole expérimental optimisé d’une méthode de dosage simultané de la Spiramycine et du Métronidazole par chromatographie en phase liquide à haute performance à polarité de phase inversée (HPLC). Les paramètres chromatographiques optimisés sont :

* Une longueur d’onde d’analyse à 242 nm.
* Un pH de la solution tampon égal 2,8.
* Une phase mobile composée de 30 % d’acétonitrile et 70 % de tampon phosphate de concentration molaire 0,05M.

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué cette méthode chromatographique optimisée pour doser notre médicament étudié « Bi-spirogyl ». La validation de cette méthode nous a permis de conclure que cette méthode d’analyse par HPLC est spécifique pour le dosage simultané de la Spiramycine et du Métronidazole. Finalement, on a effectué une étude de la stabilité du produit fini dans le but de garantir sa stabilité dans le temps et sous l’effet de plusieurs facteurs environnementaux, citant à titre d’exemples la température et l’humidité. En effet, les tests de stress sont l’outil majeur à utiliser dans les buts de prévenir les problèmes de stabilité et d’identifier les produits et les schémas de dégradation au sein des produits pharmaceutiques. En perspective, il serait intéressant de prolonger ce travail par une étude d’optimisation des autres facteurs, afin de modéliser l’influence de chaque paramètre sur le résultat final. Pour pouvoir ensuite établir des conditions optimales pour l’analyse.

Références bibliographiques

[1] : Legifrance.gouv.fr, Code de la santé publique - Article L5111-1,

https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006689867

[2] : Ansm.sante.fr, Glossaire, http://ansm.sante.fr/Glossaire/(filter)/S#term\_25599

[3] : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, Les médicaments génériques : des médicaments à part entière, Décembre 2012

[4] : Physique-chimie.asso-web.com, principe actif formulation identification, http://physique-chimie.asso-web.com/uploaded/chapitre-principe-actif-formulation-identification.pdf

[5] : Document interne SIPHAT

[6] : Wikipédia, Comprimé, https://fr.wikipedia.org/wiki/Comprim%C3%A9

[7] : Dictionnaire.acadpharm.org, Spiramycine,

http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Spiramycine

[8] : Pharmacopée Européenne 8.0, 2013

[9] : Dictionnaire.acadpharm.org, Métronidazole, http://dictionnaire.acadpharm.org/w/M%C3%A9tronidazole

[10] : Gwenola Burgot, Jean-Louis Burgot

Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques, 3éme édition, Lavoisier, 1 févr. 2011

[11] : LOGEAIS Maxime, Optimisation de la productivité des méthodes analytiques de contrôle d’un médicament, THÈSE POUR LE DIPLOME D’ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE Université de POITIERS Faculté de Médecine et de Pharmacie Année 2013

[12] : Biotech.spip.ac-rouen.fr, HPLC Principe et appareillage,

<http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>

[13] : Francis Rouessac, Annick Rouessac

ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6éme édition, Dunod, Paris, 2004

[14] : MAXIM MAHEUX, STRATEGIES ANALYTIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE AVEC DETECTION EN SPECTROMETRIE DE MASSE AFIN D'EVALUER L'ACTIVITE DE NEUF ENZYMES DU CYTOCHROME P450, DEPARTEMENT DE CHIMIE FACULTE DES SCIENCES ET DE GENIE UNIVERSITE LAVAL QUEBEC 2012

[15] : Dr Thierry Briere - Professeur agrégé – Département de Chimie, Université de La Réunion, (2001)

[16]: ac-nancy-metz.fr, pdf\_chimie,

<http://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/CHIM/Jumber/pdf_chimie/HPLC.pdf>

[17]: bts.chimie.encpb.free.fr, chromatographie\_clhp,

<http://bts.chimie.encpb.free.fr/11_12/TP/Orga/08_09_10/10_chromatographie_clhp.pdf>

[18] :Mr. Raouf Medimagh-INRAP, Cours instrumentation pour les ingénieurs en chimie analytique et instrumentation, Faculté des Sciences de Tunis 2015.

[19]:

[20]: ICH: International Conference on Harmonisation, Q2 (R1) 2005: validation of analytical procedures test and methodology

[21] : MOUHSIN Mouad, Validation analytique par profil d’exactitude de la méthode de dosage simultané de métronidazole et de spiramycine par HPLC

MEMOIRE DE FIN D’ETUDES 2014-2015

[22] : Gisèle FERRARI, Carine GARCIA, Daniel CHOPINEAUX, Martine PERRIN

Validation d'une méthode de dosage de la cocaïne dans les produits de saisies par CLHP/UVBD

Annales de Toxicologie Analytique, vol. XV, n° 3, 2003

[23] : Validation des méthodes d’analyse Application à la microbiologie des eaux

Protocole de validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence, Révision 2 – Adoptée par AFNOR Certification le 17 mai 2013

[24] : NF ISO 5725-1, Application de la statistique Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure-Partie 1/principes généraux et définitions

[25] :Dictionnaire.acadpharm.org, Exactitude,

http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Exactitude

[26] : Marie-Dominique Blanchin, Validation des méthodes d'analyse, Journées Qualité et Chimie 2010 Une démarche qualité au service de la chimie Autrans - 14 octobre 2010

[27] : VAISALA NOTE D’APPLICATION, Garantir de meilleures études de stabilité : Conformité du monitoring environnemental et des cartographies selon les directives FDA/ICH

Vaisala 2013

[28] : Études de stabilité des médicaments, Lncpp/cecomed 2010

[www.sante.dz/lncpp/lncpp-formation/stabilite.pdf](http://www.sante.dz/lncpp/lncpp-formation/stabilite.pdf)

[29] Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, Conservation des médicaments en cas de vague de chaleur, ANSM – 19/07/2012

[30] : Stabilité des médicaments en milieu pré hospitalier, Stage 5ème AHU (SAMU) 2013-2014

[31] Antoine SCODELLARO, Revue du processus des études de stabilité dans l’industrie pharmaceutique : de la règlementation à la réalisation et jusqu'à l’exploitation des tendances observées

Thèse pour le diplôme d’état de docteur en pharmacie, université de Rouen u.f.r. de médecine et de pharmacie année 2013

[32]: ICH: International Conference on Harmonisation, Q1A (R2) 2003: Stability testing of New Drug Substances and Products.

<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf>

[33] : Pharmacie galénique, Chapitre 6, les comprimés, Faculté de pharmacie de Monastir - dcep 1 2013 – 2014

[34] : Les contrôles pharmaco techniques, Lncpp/ cecomed 2010

<http://www.ands.dz/lncpp/lncpp-formation/pharmacotechnie.pdf>

[35]: Development of Validated Chromatographic Methods for the Simultaneous Determination of Metronidazole and Spiramycin in Tablets, Chromatographia, February 2009, Volume 69, Issue 3, pp 345-350

# Annexes

## Annexe A : Les chromatogrammes

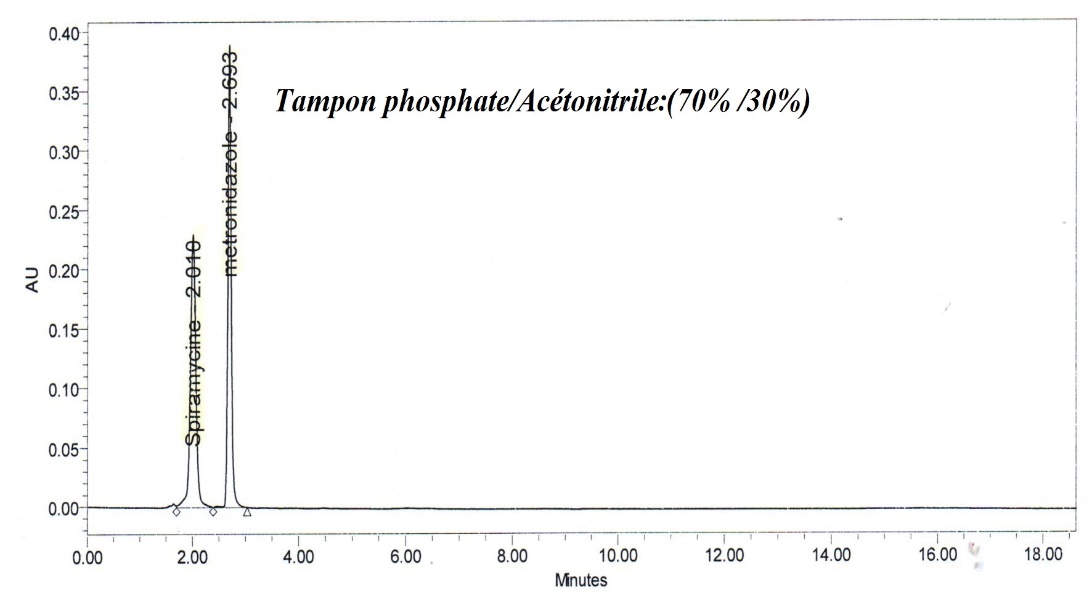
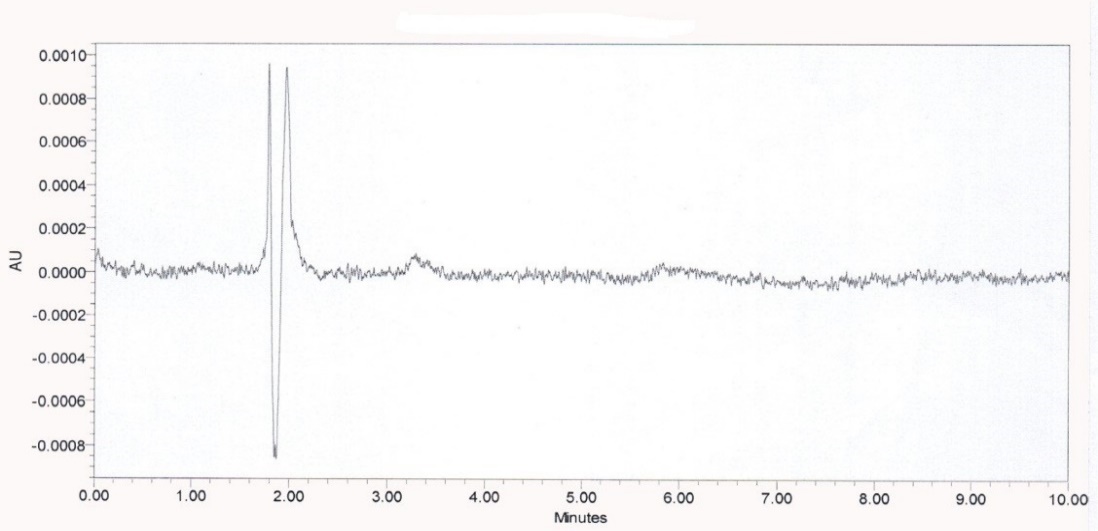
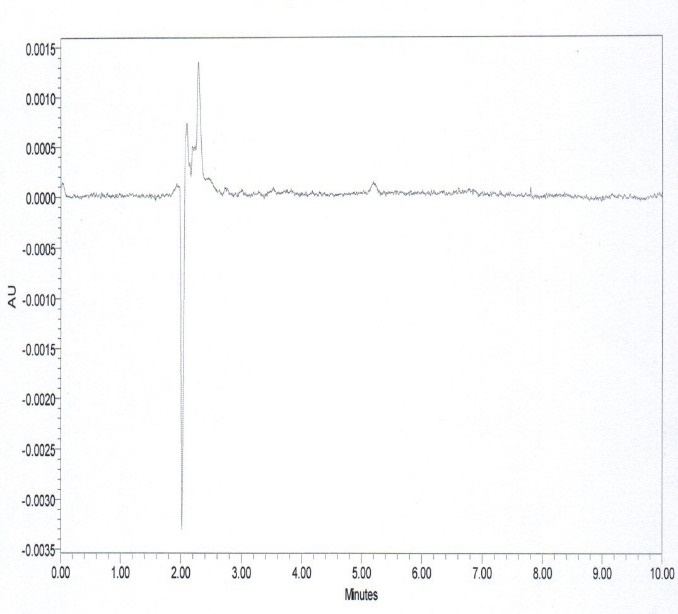


Figure A-1 : Effet de la variation de la phase mobile sur la rétention des deux principes actifs

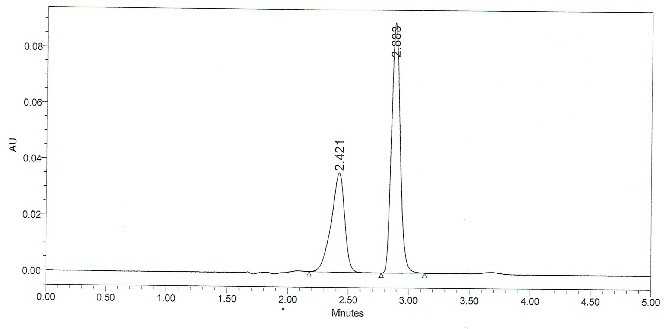


*Chromatogramme de placébo*

*Chromatogramme de la phase mobile*

*Chromatogramme des principes actifs seuls*

*Chromatogramme de la forme pharmaceutique reconstituée*



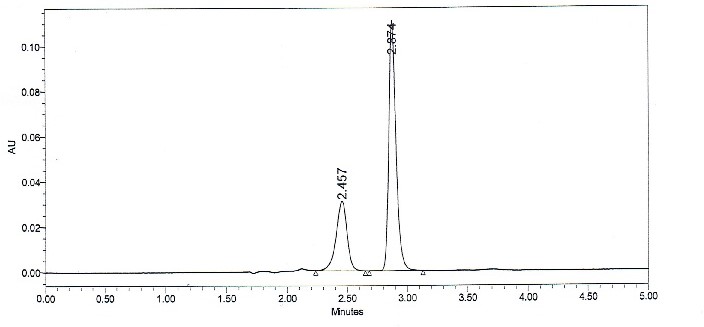


Figure A-2 : Étude de spécificité de la méthode de dosage

## Annexe B : Étude de stabilité de « Bi-spirogyl »

Figure B- : Étude de stabilité de « Bi-spirogyl » par dégradation accélérée pour les trois lots

Figure B- : Étude de stabilité de « Bi-spirogyl » en temps réel pour les trois lots

## Annexe C : Formules statistiques

Tableau C-1 : Formules statistiques générales

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres à calculer | Symboles | Formules |
| Moyenne arithmétique |  |  |
| Moyenne générale des xij |  |  |
| Moyenne arithmétique |  |  |
| Moyenne générale des yij |  |  |
| Somme des carrés des écarts pour xij |  |  |
| Somme des carrés des écarts pour yij |  |  |
| Somme des produits des écarts |  |  |

Tableau C-2 : Formules statistiques du test de Cochran

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres à calculer | Symboles | Formules |
| Variance pour chaque échantillon |  |  |
| Somme des variances |  |  |
| Variance maximale |  | - |
| Fonction de Cochran |  |  |

Tableau C-3 : Formules statistiques des tests de Student

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres à calculer | Symboles | Formules |
| Variance résiduelle |  |  |
| Écart type de l'ordonnée à l'origine |  |  |
| Écart type de la pente |  |  |

Tableau C-4 : Formules statistiques du test du Fisher

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Variations** | **DDL** | **SCE** | **Variances** | **FCalculée** | **FCritique** |
| Variation totale |  |  |  |  |  |
| Variation due à la régression |  |  |  |
| Variation résiduelle |  |  |  |

Tableau C-5 : Formules statistiques du test de validité des moyennes

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Variations** | **DDL** | **SCE** | **Variances** | **FCalculée** | **FCritique** |
| Variation totale |  |  |  |  |  |
| Variation intergroupe |  |  |  |
| Variation intragroupe |  |  |  |

Tableau C-6 : Formules statistiques pour l’étude de la fidélité

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres à calculer | Symboles | Formules |
| Nombre de jours | p | - |
| Nombre de répétition | n | - |
| Nombre total des mesures | N |  |
| Écart type |  |  |
| Écart type de la moyenne arithmétique |  |  |
| Coefficient de variation de répétabilité |  |  |
| Nombre moyen corrigé de répétition |  |  |
| Variance de reproductibilité interne |  |  |
| Écart type de reproductibilité interne |  |  |
| Variance intra-niveau |  |  |
| Somme des carrées des écarts intra-niveau |  |  |
| Variance inter-niveau |  |  |
| Somme des carrées des écarts inter-niveau |  |  |
| Coefficient de variation de fidélité intermédiaire |  |  |

## Annexe D : Validation analytique

### D.1. Étude de la linéarité

Tableau D-1 : Résultats de l’étude de la linéarité du PA1 seul

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA1 (%) | | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Masse expérimentale (mg) | | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 |
| Concentration (mg/mL) | |  |  |  |  |  |
| Aires des pics | Jour1 | 104706 | 169997 | 211938 | 269898 | 301658 |
| Jour2 | 105003 | 166428 | 211205 | 272431 | 304816 |
| Jour3 | 106529 | 166935 | 211658 | 273121 | 305261 |
| Moyenne des surfaces | | 105412,67 | 167786,67 | 211600,33 | 271816,67 | 303911,67 |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA2 (%) | | **40** | **60** | **80** | **100** | **120** |
| Masse expérimentale (mg) | | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 |
| Concentration (mg/mL) | |  |  |  |  |  |
| Aires des pics | Jour1 | 166918 | 287439 | 342646 | 437175 | 491213 |
| Jour2 | 169218 | 276224 | 342477 | 442377 | 496341 |
| Jour3 | 171150 | 272560 | 343308 | 443644 | 496186 |
| Moyenne des surfaces | | 169095,33 | 278741,00 | 342810,33 | 441065,33 | 494580,00 |

Tableau D-2 : Résultats de l’étude de la linéarité du PA2 seul

Tableau D-3 : Résultats de l’étude de la linéarité du PA1 dans la FPR

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA1 (%) | | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Masse expérimentale (mg) | | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 |
| Concentration (mg/mL) | |  |  |  |  |  |
| Aires des pics | Jour1 | 104114 | 155896 | 208398 | 259398 | 312137 |
| Jour2 | 104118 | 155785 | 209487 | 258487 | 312632 |
| Jour3 | 105143 | 156474 | 207103 | 260103 | 312378 |
| Moyenne des surfaces | | 104458,33 | 156051,67 | 208329,33 | 259329,33 | 312382,33 |

Tableau D-4 : Résultats de l’étude de la linéarité du PA2 dans la FPR

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA2 (%) | | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Masse expérimentale (mg) | | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 |
| Concentration (mg/mL) | |  |  |  |  |  |
| Aires des pics | Jour1 | 168110 | 255383 | 345744 | 432408 | 510752 |
| Jour2 | 170101 | 254789 | 341173 | 433102 | 512990 |
| Jour3 | 170865 | 253546 | 340034 | 430466 | 511647 |
| Moyenne des aires | | 169692,0 | 254572,67 | 342317,00 | 431992,00 | 511796,33 |

#### D.1.1. Test de Cochran

Tableau D-5 : Résultats du test de Cochran pour le PA1 seul

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Groupe i | 40% | 60% | 80% | 100% | 120% |
|  | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
|  | 105412,67 | 167786,67 | 211600,33 | 271816,67 | 303911,67 |
|  | 212105,60 | | | | |
| Si 2 | 956702,33 | 3728442,33 | 136816,33 | 2879986,33 | 3858766,33 |
| S2 | 11560713,67 | | | | |
| S2max | 3858766,33 | | | | |
| Ccalculé | 0,334 | | | | |
| Ccritique (0,05 ; 5 ; 2) | 0,684 | | | | |
| Ccritique (0,01 ; 5 ; 2) | 0,788 | | | | |

Tableau D-6 : Résultats du test de Cochran pour le PA2 seul

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Groupe i | 40% | 60% | 80% | 100% | 120% |
|  | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
|  | 169095,33 | 278741,00 | 342810,33 | 441065,33 | 494580,00 |
|  | 345258,40 | | | | |
| Si 2 | 4488741,33 | 60097627,00 | 192894,33 | 11752342,33 | 8508523 |
| S2 | 85040128,00 | | | | |
| S2max | 60097627,00 | | | | |
| Ccalculé | 0,607 | | | | |
| Ccritique (0,05 ; 5 ; 2) | 0,684 | | | | |
| Ccritique (0,01 ; 5 ; 2) | 0,788 | | | | |

Tableau D-7 : Résultats du test de Cochran pour le PA1 dans la FPR

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Groupe i | 40% | 60% | 80% | 100% | 120% |
|  | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
|  | 105791,67 | 156051,67 | 211996,00 | 261662,67 | 312382,33 |
|  | 209576,87 | | | | |
| Si 2 | 344580,33 | 136854,33 | 7368067,00 | 2915400,33 | 61270,33 |
| S2 | 10826172,33 | | | | |
| S2max | 7368067,00 | | | | |
| Ccalculé | 0,681 | | | | |
| Ccritique (0,05 ; 5 ; 2) | 0,684 | | | | |
| Ccritique (0,01 ; 5 ; 2) | 0,788 | | | | |

Tableau D-8 : Résultats du test de Cochran pour le PA2 dans la FPR

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Groupe i | 40% | 60% | 80% | 100% | 120% |
|  | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
|  | 169692,00 | 254572,67 | 342317,00 | 431992,00 | 511796,33 |
|  | 342074,00 | | | | |
| Si 2 | 2022967,00 | 878742,33 | 9132577,00 | 1866916,00 | 1268886,33 |
| S2 | 15170088,67 | | | | |
| S2max | 9132577,00 | | | | |
| Ccalculé | 0,602 | | | | |
| Ccritique (0,05 ; 5 ; 2) | 0,684 | | | | |
| Ccritique (0,01 ; 5 ; 2) | 0,788 | | | | |

#### D.1.2. Tests de Student

##### D.1.2.1. Comparaison des ordonnées à l’origine avec zéro

Tableau D-9 : Résultats du test de comparaison des ordonnées à l’origine avec zéro

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Paramètres** | **PA1** | | **PA2** | |
| **PAS** | **FPR** | **PAS** | **FPR** |
|  | 11694,40 | 2259,94 | 19940,93 | 2577,20 |
| S2Res | 1,8359.107 | 1,65.106 | 6,1172.107 | 1,74865.106 |
| Sa | 5,5316. 103 | 1,394.103 | 1,0097.104 | 1,7072. 103 |
| tcalculé | 2,114 | 1,622 | 1,975 | 1,510 |
| t(0,01 ; 13) | 3,012 | | | |

##### D.1.2.2. Comparaison des ordonnées à l’origine des droites de régression

Tableau D-10 : Résultats du test de comparaison des ordonnées à l’origine

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres | D1 et D3 | D2 et D4 |
|  | 11694,40 | 19940,93 |
|  | 2259,94 | 2577,4 |
|  | 9434,46 | 17363,53 |
|  | 3,060.107 | 1,0195.108 |
|  | 1,942.106 | 2,9144.106 |
|  | 5704,43 | 10240,48 |
|  | 1,654 | 1,696 |
| t(0,01 ; 26) | 2,779 | |

##### D.1.2.3. Comparaison des pentes des droites de régression

Tableau D-11 : Résultats du test de comparaison des pentes des droites de régression

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres | D1 et D3 | D2 et D4 |
|  | 16700933,33 | 16265873,40 |
|  | 17293077,33 | 17232559,8 |
|  | 592144 | 966686,4 |
|  | 2,0399.107 | 2,4469.1011 |
|  | 1,295.1010 | 6,9946.109 |
|  | 465764,83 | 501679 |
|  | 1,271 | 1,927 |
| t(0,01 ; 26) | 2,779 | |

#### D.1.3. Tests de Fisher : Test de l'existence d'une pente significative

Tableau D-12 : Résultats du test de l'existence d'une pente significative pour PA1

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Variations | DDL | SCE | Variances | Fl | FCritique |
| Variation totale | 14 | 7,60.1010 |  | 1324,57 | 9,07 |
| Variation due à la régression | 1 | 7,53.1010 | 7,53.1010 |
| Variation résiduelle | 13 | 7,39.108 | 5,69.107 |

Tableau D-13 : Résultats du test de l'existence d'une pente significative pour PA2

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Variations | DDL | SCE | Variances | Fl | FCritique |
| Variation totale | 14 | 2,01.1011 |  | 1009,34 | 9,07 |
| Variation due à la régression | 1 | 1,98.1011 | 1,98.1011 |
| Variation résiduelle | 13 | 2,56.109 | 1,97.108 |

Tableau D-14 : Résultats du test de l'existence d'une pente significative pour FPR1

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Variations | DDL | SCE | Variances | Fl | FCritique |
| Variation totale | 14 | 8,08.1010 |  | 20911,56 | 9,07 |
| Variation due à la régression | 1 | 8,07.1010 | 8,07.1010 |
| Variation résiduelle | 13 | 5,02.107 | 3,86.106 |

Tableau D-15 : Résultats du test de l'existence d'une pente significative pour FPR2

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Variations | DDL | SCE | Variances | Fl | FCritique |
| Variation totale | 14 | 2,228.1011 |  | 29381,91 | 9,07 |
| Variation due à la régression | 1 | 2,227.1011 | 2,227.1011 |
| Variation résiduelle | 13 | 9,854.107 | 7,580.106 |

### D.2. Étude de la fidélité

#### D.2.1. Test de Cochran

Tableau D-16 : Résultats du test de Cochran pour le PA1

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nombre de jours | 1 | 2 | 3 |
|  | 6 | 6 | 6 |
|  | 259048,83 | 271881,67 | 267142,17 |
| Si 2 | 32363799,37 | 1284896,67 | 63402777,37 |
| SCE i | 161818996,83 | 6424483,33 | 317013886,83 |
|  | 266024,22 | | |
| S2 | 97051473,40 | | |
| SCE | 485257367,00 | | |
| S2 max | 63402777,37 | | |
| C calculé | 0,653 | | |
| C critique (0,05 ; 3 ; 5) | 0,746 | | |
| C critique (0,01 ; 3 ; 5) | 0,834 | | |

Tableau D-17 : Résultats du test de Cochran pour le PA2

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nombre de jours | 1 | 2 | 3 |
|  | 6 | 6 | 6 |
|  | 417164,6667 | 442696,6667 | 424403,5 |
| Si 2 | 2484709,867 | 8226212,267 | 5726064,7 |
| SCE i | 12423549,33 | 41131061,33 | 28630323,5 |
|  | 428088,2778 | | |
| S2 | 16436986,83 | | |
| SCE | 82184934,17 | | |
| S2 max | 8226212,267 | | |
| C calculé | 0,500 | | |
| C critique (0,05 ; 3 ; 5) | 0,746 | | |
| C critique (0,01 ; 3 ; 5) | 0,834 | | |

#### D.2.2. Évaluation de la fidélité

Tableau D-18 : Résultats de l’étude de la répétabilité pour le PA1

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nombre d'essai | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| Aires des pics | 266951 | 260258 | 274854 | 278751 | 260587 | 261452 |
| Moyenne | 267142,17 | | | | | |
| Écart type de la moyenne arithmétique | 3250,71 | | | | | |
| CVr (%) | 1,22 | | | | | |

Tableau D-19 : Résultat de l’étude de la répétabilité pour le PA2

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nombre d'essai | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Aires des pics | 423175 | 427377 | 420644 | 425379 | 423771 | 426075 |
| Moyenne | 424403,50 | | | | | |
| Écart type de la moyenne arithmétique | 976,91 | | | | | |
| CVr (%) | 0,23 | | | | | |

Tableau D-20 : Résultats de l’étude de la fidélité intermédiaire

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Paramètres à calculer | Valeurs | |
| *PA1* | *PA2* |
|  | 3 | 3 |
|  | 5 | 5 |
|  | 15 | 15 |
|  | 12 | 12 |
|  | 8,31.103 | 1,33.104 |
|  | 4,85.108 | 8,22.107 |
|  | 3,24.107 | 5,48.106 |
|  | 5,05.108 | 2,08.109 |
|  | 3,67.107 | 1,72.108 |
| CVR(%) | 3,12 | 3,11 |

### D.3. Étude d’exactitude

#### D.3.1. Calcul des recouvrements

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA1  (%) | [xij] introduite (µg/mL) | Aire du pic yij | [xij] retrouvée (µg/mL) | Recouvrement yij(%) |
| 40 | 6 | 104114  104118  105143 | 5,75  5,75  5,80 | 95,76  95,76  96,70 |
| 60 | 9 | 155896  155785  156474 | 8,60  8,60  8,63 | 95,59  95,52  95,94 |
| 80 | 12 | 208398  209487  207103 | 11,50  11,56  11,43 | 95,84  96,34  95,24 |
| 100 | 15 | 259398  258487  260103 | 14,31  14,26  14,35 | 95,43  95,10  95,69 |
| 120 | 18 | 312137  312632  312378 | 17,23  17,25  17,24 | 95,69  95,85  95,77 |

Tableau D-21 : Résultats du calcul de recouvrements pour le PA1 dans la FPR

Tableau D-22 : Résultats du calcul de recouvrements pour le PA2 dans la FPR

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA2  (%) | [xij] introduite (µg/mL) | Aire du pic yij | [xij] retrouvée (µg/mL) | Recouvrement yij(%) |
| 40 | 10 | 168110  170101  170865 | 9,53  9,64  9,68 | 95,29  96,41  96,85 |
| 60 | 15 | 255383  254789  253546 | 14,48  14,44  14,37 | 96,50  96,28  95,81 |
| 80 | 20 | 345744  341173  340034 | 19,60  19,34  19,27 | 97,99  96,69  96,37 |
| 100 | 25 | 432408  433102  430466 | 24,51  24,55  24,40 | 98,04  98,19  97,60 |
| 120 | 30 | 510752  512990  511647 | 28,95  29,08  29,00 | 96,50  96,92  96,67 |

#### D.3.2. Test de Cochran

Tableau D-23 : Résultats du test de Cochran du PA1

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA1 (%) | 40% | 60% | 80% | 100% | 120% |
| Si 2 | 0,297 | 0,051 | 0,301 | 0,089 | 0,006 |
| S2 | 0,745 | | | | |
| Ccalculé | 0,405 | | | | |
| Ccritique (0,05 ; 5 ; 2) | 0,684 | | | | |
| Ccritique (0,01 ; 5 ; 2) | 0,788 | | | | |

Tableau D-24 : Résultats du test de Cochran du PA2

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Teneur en PA2 (%) | 40% | 60% | 80% | 100% | 120% |
| Si 2 | 0,650 | 0,125 | 0,734 | 0,096 | 0,045 |
| S2 | 1,650 | | | | |
| Ccalculé | 0,445 | | | | |
| Ccritique (0,05 ; 5 ; 2) | 0,684 | | | | |
| Ccritique (0,01 ; 5 ; 2) | 0,788 | | | | |

#### D.3.3. Test de validité des moyennes

Tableau D-25 : Résultats du test de validité des moyennes pour le PA1

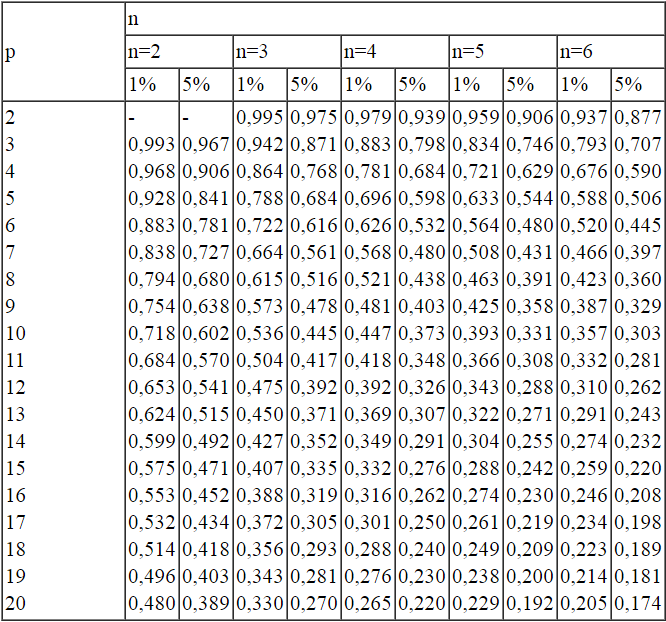
|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Variation | DDL | SCE | Variance | F2 | FCritique |
| Variation intragroupes | 10 | 1,4894 | 0,1489 | 1,16 | 5,99 |
| Variation intergroupes | 4 | 0,6933 | 0,1733 |
| Variation totale | 14 | 2,1827 | 0,16 |

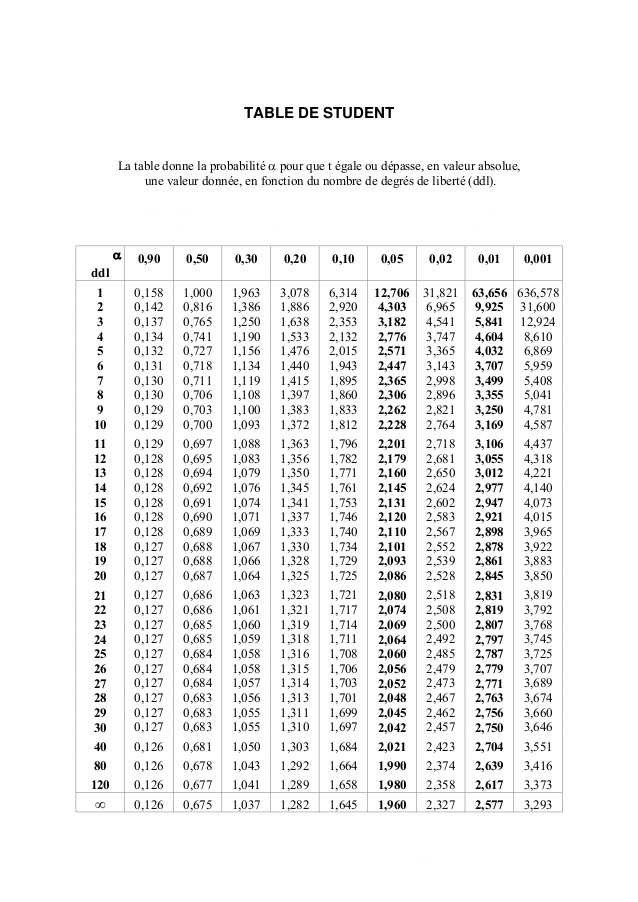
Tableau D-26 : Résultats du test de validité des moyennes pour le PA2

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Variation | DDL | SCE | Variance | F2 | FCritique |
| Variation intragroupes | 10 | 3,30 | 0,33 | 4,79 | 5,99 |
| Variation intergroupes | 4 | 6,3232 | 1,5808 |
| Variation totale | 14 | 9,6235 | 0,6874 |

## Annexe E : Tables statistiques

### Table de Cochran

****



### Table de Fisher

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ν1  ν2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 6 | 13.75 | 10.92 | 9.78 | 9.15 | 8.75 | 8.47 | 8.26 | 8.10 | 7.98 | 7.87 | 7.79 | 7.72 | 7.66 | 7.60 | 7.56 |
| 7 | 12.25 | 9.55 | 8.45 | 7.85 | 7.46 | 7.19 | 6.99 | 6.84 | 6.72 | 6.62 | 6.54 | 6.47 | 6.41 | 6.36 | 6.31 |
| 8 | 11.26 | 8.65 | 7.59 | 7.01 | 6.63 | 6.37 | 6.18 | 6.03 | 5.91 | 5.81 | 5.73 | 5.67 | 5.61 | 5.56 | 5.52 |
| 9 | 10.56 | 8.02 | 6.99 | 6.42 | 6.06 | 5.80 | 5.61 | 5.47 | 5.35 | 5.26 | 5.18 | 5.11 | 5.05 | 5.01 | 4.96 |
| 10 | 10.04 | 7.56 | 6.55 | 5.99 | **5.64** | 5.39 | 5.20 | 5.06 | 4.94 | 4.85 | 4.77 | 4.71 | 4.65 | 4.60 | 4.56 |
| 11 | 9.65 | 7.21 | 6.22 | 5.67 | 5.32 | 5.07 | 4.89 | 4.74 | 4.63 | 4.54 | 4.46 | 4.40 | 4.34 | 4.29 | 4.25 |
| 12 | 9.33 | 6.93 | 5.95 | 5.41 | 5.06 | 4.82 | 4.64 | 4.50 | 4.39 | 4.30 | 4.22 | 4.16 | 4.10 | 4.05 | 4.01 |
| 13 | 9.07 | 6.70 | 5.74 | 5.21 | 4.86 | 4.62 | 4.44 | 4.30 | 4.19 | 4.10 | 4.02 | 3.96 | 3.91 | 3.86 | 3.82 |
| 14 | 8.86 | 6.51 | 5.56 | 5.04 | 4.69 | 4.46 | 4.28 | 4.14 | 4.03 | 3.94 | 3.86 | 3.80 | 3.75 | 3.70 | 3.66 |
| 15 | 8.68 | 6.36 | 5.42 | 4.89 | 4.56 | 4.32 | 4.14 | 4.00 | 3.89 | 3.80 | 3.73 | 3.67 | 3.61 | 3.56 | 3.52 |
| 16 | 8.53 | 6.23 | 5.29 | 4.77 | 4.44 | 4.20 | 4.03 | 3.89 | 3.78 | 3.69 | 3.62 | 3.55 | 3.50 | 3.45 | 3.41 |
| 17 | 8.40 | 6.11 | 5.19 | 4.67 | 4.34 | 4.10 | 3.93 | 3.79 | 3.68 | 3.59 | 3.52 | 3.46 | 3.40 | 3.35 | 3.31 |
| 18 | 8.29 | 6.01 | 5.09 | 4.58 | 4.25 | 4.01 | 3.84 | 3.71 | 3.60 | 3.51 | 3.43 | 3.37 | 3.32 | 3.27 | 3.23 |
| 19 | 8.18 | 5.93 | 5.01 | 4.50 | 4.17 | 3.94 | 3.77 | 3.63 | 3.52 | 3.43 | 3.36 | 3.30 | 3.24 | 3.19 | 3.15 |
| 20 | 8.10 | 5.85 | 4.94 | 4.43 | 4.10 | 3.87 | 3.70 | 3.56 | 3.46 | 3.37 | 3.29 | 3.23 | 3.18 | 3.13 | 3.09 |
| 21 | 8.02 | 5.78 | 4.87 | 4.37 | 4.04 | 3.81 | 3.64 | 3.51 | 3.40 | 3.31 | 3.24 | 3.17 | 3.12 | 3.07 | 3.03 |
| 22 | 7.95 | 5.72 | 4.82 | 4.31 | 3.99 | 3.76 | 3.59 | 3.45 | 3.35 | 3.26 | 3.18 | 3.12 | 3.07 | 3.02 | 2.98 |
| 23 | 7.88 | 5.66 | 4.76 | 4.26 | 3.94 | 3.71 | 3.54 | 3.41 | 3.30 | 3.21 | 3.14 | 3.07 | 3.02 | 2.97 | 2.93 |
| 24 | 7.82 | 5.61 | 4.72 | 4.22 | 3.90 | 3.67 | 3.50 | 3.36 | 3.26 | 3.17 | 3.09 | 3.03 | 2.98 | 2.93 | 2.89 |
| 25 | 7.77 | 5.57 | 4.68 | 4.18 | 3.85 | 3.63 | 3.46 | 3.32 | 3.22 | 3.13 | 3.06 | 2.99 | 2.94 | 2.89 | 2.85 |

**Résumé**

L'objet de ce travail est la validation d’une méthode de dosage simultané de deux principes actifs HPLC/DAD à polarité de phases inversée selon les recommandations d’ICH (International Conference On Harmonisation). L’effet de pH de la phase mobile et de sa composition sur le temps de rétention de la Spiramycine et du Métronidazole a été étudié. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne RP-C18 (250 mm \* 4,6 mm et une granulométrie de 5 μm), type Sunfire à 25 °C à 242 nm avec une phase mobile constituée d'acétonitrile-tampon phosphate KH2PO4-0,05M de pH 2,8 (30:70, v/v) et à débit 1 mL/min. Selon les résultats de la validation, la méthode proposée est simple, spécifique, linéaire, fidèle, exacte et peut être appliquée à l'analyse du médicament « Bi-spirogyl » avec un excellent taux de recouvrement. Une étude de stabilité de médicament montre qu’il doit être conservé à une température ambiante, 25°C.

**Abstract**

The aim of the current study is to develop and validate a reverse-phase HPLC according to the recommendations of International Conference on Harmonization (ICH). The pH effect of the mobile phase and its composition on the retention time of Spiramycin and Metronidazole were studied by HPLC / DAD. Chromatographic separation was performed on a RP-C18  column (250 mm \* 4.6 mm grain size of 5 μm),type Sunfire ,at 25 °C using a diode array detector (DAD) and a mobile phase was consisted of acetonitrile-phosphate buffer 0,05 M at pH 2,8 (30:70, v/v) delivered at flow 1 mL/ min. The results of the validation, the proposed method is simple, specific, linear, precise, and accurate and could be applied to the analysis of commercial tablets « Bi-spirogyl » with an excellent recovery rate. A stability study, showed that the medicament should be conserved at 25°C.

**Coordonnées de l’entreprise où a été effectué le stage du Projet de Fin d’Études :**

**Nom :** Société des Industries Pharmaceutiques de Tunisie « SIPHAT »

**Adresse :** Z.I 2013 Ben Arous

**Téléphone :** (+216)71381222 **Fax :** (+216) 71382768

**Email :** siphat@rns.tn