



**Licence Sciences et Techniques (LST)**

*Techniques d'analyse chimique et contrôle de qualité*

*TACQ*

**PROJET**

**Contrôle de qualité d'une spécialité pharmaceutique à base du  
Rivaroxaban**

**Présenté par :**

- ◆ ALLOUCHE Fatima Zohra

**Encadré par :**

- ◆ Mr .M.ELKARBANE
- ◆ Pr .Y.KANDRI RODI

**Soutenu Le 13 Juin 2013 devant le jury composé de:**

- Pr.Y.KANDRI RODI
- Mr.M.ELKARBANE
- Pr.F.OUAZZANI CHAHDI
- Pr.A.BENTAMA

**Stage effectué à Laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments**

**Année Universitaire 2012 / 2013**

Introduction: .....	1
Chapitre 1: Présentation de l'entreprise d'accueil.....	2
I. Division du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments.....	3
1. Compétences personnelles:.....	3
2. Missions:.....	3
3. Structure:.....	3
4. Organigramme de la division du LNCM:.....	4
5. Service physico-chimique:.....	5
5.1. Missions:.....	5
6. Service des Essais biologiques:.....	5
II. La démarche assurance qualité au sein du LNCM.....	5
1. Pourquoi cette démarche qualité ?.....	5
2. Définitions: .....	5
3. La démarche assurance qualité entreprise par le LNCM à permis.....	7
3.1. En interne: .....	7
3.2. En externe: .....	7
Chapitre 2: Définition des principaux concepts:.....	8
1. Définition du Médicament:.....	9
2. Définition d'un médicament générique .....	9
2.1. Formes pharmaceutiques des médicaments.....	9
Chapitre 3: Méthodes de contrôle analytique de différentes spécialités.....	11
1. Vérification du conditionnement:.....	12
2. Les méthodes chromatographiques: .....	12
2.1. Définition:.....	12
2.2. Nature des phases:.....	12
3. Exemple des techniques chromatographiques utilise au LNCM:.....	13
3.1. Chromatographie liquide à haute performance:.....	13
3.2. Chromatographie sur couche mince: .....	14
3.3. Chromatographie en phase gazeuse:.....	16
4. La spectroscopie infrarouge:.....	17
5. Principaux tests galéniques:.....	18
5.1. Test de dissolution des formes solides:.....	18
6. Méthodes de dosage des quantités libérée:.....	19
Chapitre 4: Partie pratique:.....	20

I. Contrôle physico-chimique du médicament:.....	21
1. Description du médicament.....	21
2. Matériels et Réactifs:.....	22
3. Uniformité de masse:.....	23
4. Identification et dosage du principe actif dans le produit fini par HPLC:.....	24
5. Dosage des impuretés de rivaroxaban dans le PF par HPLC:.....	30
6. Test de dissolution:.....	32
7. Uniformité de teneur:.....	33
8. Discussion des résultats:.....	34
Conclusion générale.....	35
Références bibliographiques.....	36
Wébographie.....	37

L'industrie pharmaceutique est un secteur industriel chargé de la conception, la fabrication, du conditionnement et de la commercialisation des spécialités pharmaceutiques, pour la prévention et le traitement des maladies. Les spécialités pharmaceutiques destinées à l'homme doivent nécessairement, avant leur distribution, avoir reçu une autorisation de mise sur le marché des autorités compétentes. Ceci est effectué grâce à des sociétés qui sont chargées de contrôler les médicaments pour leur commercialisation sur le marché sans aucun danger pour la santé publique.

La fabrication des médicaments fait l'objet de contrôles rigoureux tout au long du procédé de fabrication. Un médicament n'est pas une simple mixture d'ingrédients, il est très complexe, il doit répondre aux trois critères : qualité, sécurité et efficacité. Le suivi de la qualité d'un médicament regroupe plusieurs activités et consiste notamment en la réalisation de différentes analyses physico-chimiques et biologiques de la matière première et du produit fini selon des procédures de contrôle bien définies et le respect de normes strictes.

**Le présent travail est divisé en deux parties:**

## ➤ **Partie I :**

- ✿ Présentation du LNCM et de ses activités, définition de quelques concepts pharmacologiques générales, ainsi que les grandes étapes de la démarche assurance qualité.
- ✿ Les différentes méthodes d'analyses qui se réalisent au service physico-chimie.

## ➤ **Partie II :**

- ✿ Application de quelques méthodes analytiques au contrôle d'un médicament dont le principe actif est **rivaroxaban**.

## *Presentation de l'entreprise*

*La direction du médicament et de la pharmacie est créée en 1969 par Décret n°2172-373 du 24 Avril 1974 qui fixe ses prérogatives. Le LNCM est une division de la DMP, elle est inscrite sur la liste des laboratoires officiels de l'OMS. Le Laboratoire national de contrôle des médicaments est référence de la ligue arabe, il est membre observateur de la Pharmacopée Européenne, Membre du réseau des laboratoires nationaux européens du contrôle des médicaments, puis accrédité par le réseau EDQM (Direction Européenne de Qualité des Médicaments) et OMS en 2011.*

### **I. Division du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments :**

La direction est composée de deux divisions :

- Division de la pharmacie.
- Division du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM).

Les objectifs de la Division de la pharmacie :

- Fixe le cadre des prix des médicaments et des spécialités pharmaceutiques ;
- Assure le contrôle technique et la qualité dans le cadre de la législation et de la réglementation en vigueur, en se basant sur les résultats des expertises analytiques et documentaires fournis par le LNCM.

#### **1. Compétences personnelles :**

Selon une enquête, le LNCM emploie une centaine de personnes de haute formation :

- 18 pharmaciens dont un professeur en pharmacologie
- 38 docteurs scientifiques
- 5 ingénieurs
- 20 préparateurs en pharmacie
- 4 techniciens de laboratoires
- 3 secrétaires et 5 agents de service

## **2. Missions :**

Le LNCM a pour missions :

- Contrôle analytique des médicaments (matière première et produit fini), des dispositifs Médicaux.
- Évaluation des documentations, chimiques, biologiques et pharmaceutiques.

## **3. Structure :**

Le laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) comprend quatre services et quatre unités.

#### 4. Organigramme de la division du LNCM :

## Division du laboratoire nationale de contrôle des médicaments LNCM

Unité Métrologie

Unité Assurance qualité

Unité d'Informatique

Unité de Réserve

Service physico-chimique

Service assurance qualité

Service Essais Biologiques

Service Dispositifs Médicaux

Cellule de Suivi et de Répartition

Evaluation et Gestion des dossiers d'ADSP

Expertises Microbiologiques

Elaboration des Normes relatives aux Dispositifs Médicaux

Expertises Physico-chimiques

Unité Centrale de Réception et d'Enregistrement

Expertises Toxicologiques

Expertises des Dispositifs Médicaux

Expertises Pharmaco techniques

Cellule de veille Sanitaire-Réclamations

Cellule de Contrôle des Vaccins et Sérums

Expertise des Articles de Puériculture

Expertises Radio pharmaceutiques

Etude de Concordance des BA des Médicaments(PA et PF)

Unité Biotechnologie

Expertises des Préservatifs

## **5. Service Physico-chimique :**

### 5.1. Mission :

- Il a pour mission le contrôle documentaire et surtout analytique (des spécialités pharmaceutiques, matières premières, produits finis et conditionnement).
- Il s'occupe le contrôle physico-chimique des médicaments, et des matières premières.

## **6. Service des Essais Biologiques :**

Le service des essais biologiques contrôle, sur le plan biologique, des médicaments et des spécialités pharmaceutiques, des objectifs de pansement et de tout autre article destiné à l'usage de la médecine humaine ainsi que des sérums et des vaccins.

## **II. La démarche assurance qualité au sein du LNCM :**

A nos jours, la démarche qualité est devenue une priorité dans tous les domaines d'activité, le domaine de la santé publique n'échappe pas de cette évolution. Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments Marocain (LNCM) prend toutes les mesures de contrôle pour que l'efficacité et la sécurité des médicaments soient acceptables.

Le LNCM est l'autorité compétente au Maroc chargé d'assurer le contrôle de la qualité des médicaments locaux ou importés. Le contrôle se fait selon des protocoles internationaux vigueur (Ph Eu, USP...) avec la rigueur exigée par les normes des bonnes pratiques du laboratoire.

### **1. Pourquoi cette démarche qualité ?**

- L'objectif majeur est de fournir des résultats analytiques fiables et incontestables ;
- Améliorer l'organisation du circuit des échantillons ;
- Assurer une bonne traçabilité ;
- Donner une pleine confiance dans la qualité du médicament ;
- Reconnaissance internationale et intégration des instances internationales (réseau OMCL-laboratoires requalifiées OMS).

### **2. Définitions :**

Les définitions ci-dessous sont tirées de la norme Européenne ISO 9000/décembre 2000.

#### **Qualité :**

La qualité est définie par : « l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences ».

C'est un outil de gestion destiné à atteindre les objectifs fixés par l'organisme dans le cadre de la politique qualité, en veillant à réaliser l'absence totale des défauts au niveau des produits, ainsi que la prévention continue des non conformités.

#### **Exigences :**

Ce sont des besoins ou attentes formulés, habituellement implicites ou imposés.

- **Assurance qualité :**

C'est un outil du management de la qualité qui vise à donner confiance aux clients internes et externes, et garantir par des moyens de prévention l'apparition de toute non-conformité sur le produit ou le service.

- **Management de la qualité :**

Le management de la qualité est défini par : «des activités coordonnées permettant d'orienter et de contrôler un organisme en matière de qualité».

- **Conformité :**

Définie par : « la satisfaction d'une exigence».

- **Non-conformité :**

La non-conformité est définie par : « la non satisfaction d'une exigence »

- **Accréditation :**

« Reconnaissance formelle par un organisme faisant autorité de la compétence d'un laboratoire d'essais pour réaliser des essais ou types d'essais déterminés ».

- **La norme ISO 9000**

La gestion de la qualité et assurance qualité, il existe trois formes standards de ISO 9000 : ISO (9001,9002 et 9003).

- **La norme ISO 17025 :**

L'ISO/CEI 17025 contient l'ensemble des exigences que les laboratoires doivent respecter pour démontrer à leurs clients et aux autorités réglementaires qu'ils appliquent un système de management leur permettant de maîtriser entièrement leurs processus, qu'ils ont la compétence technique et sont aptes à produire des résultats techniquement valides.

### **3. La démarche qualité entreprise par le LNCM a permis :**

#### **3.1. En interne :**

- Une meilleure organisation
- Un savoir faire préservé
- La responsabilité du personnel
- Un gain de communication
- Une confiance totale dans les résultats des analyses

### 3.2. *En externe :*

- Une amélioration de la qualité du service
- Une augmentation de la confiance des clients (industriels et autorité de tutelle)
- Un bon ancrage du LNCM dans le réseau OMCL et OMS grâce à l'accréditation par le conseil de l'Europe
- La consolidation du contrôle de la qualité du médicament ouvrant ainsi d'avantage la voie au médicament marocain sur les marchés internationaux

# Chapitre 2

## Définition des principaux concepts

---

## **1. Définition du médicament**

On entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Toute substance ou composition pouvant être administrée à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier des fonctions organiques chez l'homme ou l'animal est également considérée comme médicament.

## **2. Définition d'un Médicament générique**

Un médicament générique est un médicament essentiellement similaire à un médicament original de référence.

Par médicament essentiellement similaire on entend un médicament qui a la même composition qualitative et quantitative en principe actif et la même forme pharmaceutique que le médicament original.

Les médicaments génériques sont de ce fait moins chers tout en présentant les mêmes garanties d'efficacité, de qualité et de sécurité.

### 2.1 Formes pharmaceutiques des médicaments :

La forme pharmaceutique ou bien galénique correspond à la forme sous laquelle vous prenez le médicament (comprimé, gélule, sirop, etc.).

Un médicament contient une ou des substance(s) active(s) mais aussi d'autres substances dites auxiliaires : les excipients.

#### **Principe actif :**

Est la molécule qui dans un médicament possède un effet thérapeutique. Cette substance est, la plupart du temps, en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients.

#### **Excipients :**

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

#### **Comprimés :**

Est une forme pharmaceutique solide, destinée à la voie orale, équivalent à une dose (unité de prise) qui peut contenir une ou plusieurs substances actives (principe actif). Ce sont les formes les plus utilisées.

**Gélules :**

Une gélule, ou capsule à enveloppe dure, désigne une forme galénique de médicament, solide, que l'on avale. Elle est constituée d'une enveloppe dure, creuse qui contient la substance active.

**Sirops :**

Ces formes à la base du sucre ou d'aspartam sont souvent utilisées chez les enfants, chez les patients diabétiques.

# Chapitre 3

## Méthodes de contrôle analytique de différentes spécialités

*Les médicaments sont des produits dont la qualité est garantie par le contrôle continu qu'il obtient depuis la matière première jusqu'au produit fini.*

*Le dosage et l'identification de toute molécule médicamenteuse font appel à des procédés analytiques très divers dont le choix n'est pas toujours aisé.*

## 1. Vérification du conditionnement :

Une première série d'opérations de contrôle permet de s'assurer que le lot reçu n'a pas été l'objet d'une erreur d'étiquetage lors de la manutention :

- Une vérification du libellé exact de toutes les étiquettes et des inscriptions apposées sur les divers emballages
- Une vérification de la date de fabrication et de péremption
- Une vérification du numéro de lot

## 2. Les méthodes chromatographiques :

### 2.1. Définition :

C'est une méthode de séparation, basée sur les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire.

En chromatographie les constituants d'un mélange se partagent entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Ce phénomène est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre, ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier.

### 2.2. Nature des phases :

#### Phase stationnaire

La phase stationnaire peut être solide ou liquide. Les solides, silice  $\text{SiO}_2$ , ou alumine  $\text{Al}_2\text{O}_3$  traitées, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés absorbantes.

Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince (CCM)).

La phase stationnaire peut aussi être constituée par un liquide imprégnant un support solide ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée). Ainsi en chromatographie sur papier, la phase fixe est formée par l'eau que les molécules de cellulose du papier absorbent, alors qu'en chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide peu volatil et thermiquement stable imprégnant un granulé poreux.

#### Phase mobile

La phase mobile est :

- Soit un gaz (ex : chromatographie en phase gazeuse CPG) : la phase est dite gaz vecteur ou gaz porteur.
- Soit un liquide (ex : chromatographie sur papier, couche mince) : la phase mobile est dite éluant.

### 3. Exemple des techniques chromatographiques utilisé au LNCM

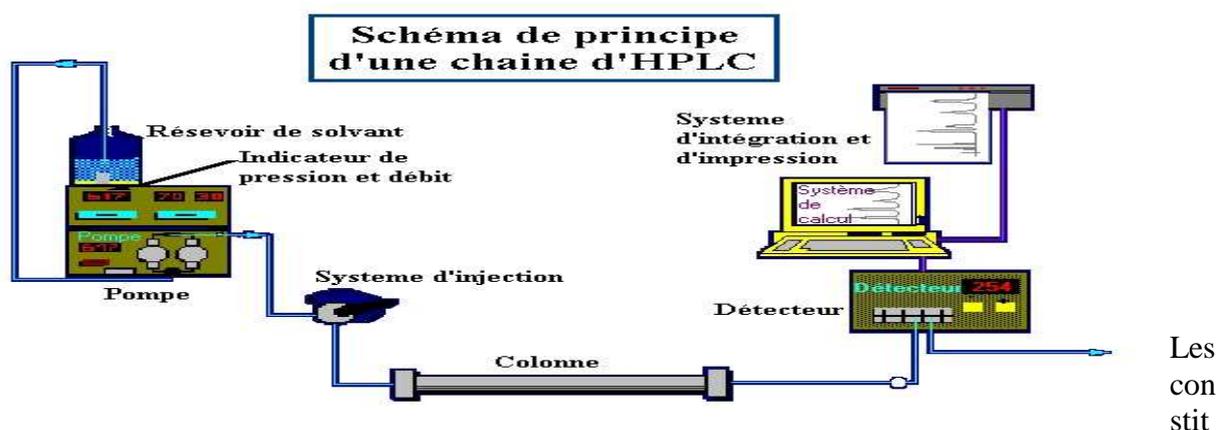
#### 3.1 . Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

##### - Principe :

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique de séparation d'un ou plusieurs composés d'un mélange pour leur identification et leur quantification. Elle est basée sur la distribution différentielle des espèces d'un mélange entre deux phases non miscibles, phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide qui traverse, à l'aide d'une pompe sous haute pression.

Les différents constituants migrent dans la colonne et se séparent en fonction de leurs: polarité, poids moléculaires et caractère ionique.

##### - Appareillage :



Composants d'appareillage :

- **Système de pompage** : permet d'aspirer la phase mobile et la pousser dans la colonne. Elle permet de travailler:
  - ✓ En mode **isocratique**, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
  - ✓ En mode **gradient**, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant avec le temps.
- **Un réservoir de solvant** : contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.
- **Vanne d'injection** : c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser.

- **Colonne chromatographique** : elle représente le cœur de l'appareillage ou à lieu la séparation.
- **Détecteur** : permettant de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne par apparition d'un signal d'intensité proportionnelle à la quantité de produit élué.

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés :

- **UV visible** (celui que nous utilisons) : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne
- **Réfractomètre** : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide.

Le choix de la phase mobile est basé essentiellement sur sa polarité, cette polarité permet de distinguer deux situations de principe :

- Si la phase stationnaire est polaire, on travail avec une phase mobile apolaire, on dit qu'il s'agit d'une chromatographie en phase normale.
- Si la phase stationnaire est apolaire, on choisit une phase mobile polaire (le plus souvent un mélange d'eau/Méthanol/Acétonitrile). C'est la chromatographie en phase inverse.

### 3.2 Chromatographie sur couche mince (CCM) :

#### - **Généralité :**

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

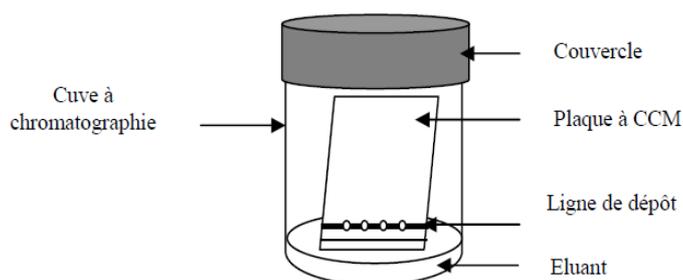
#### - **Principe de la séparation entre phases**

Il peut être se déroulé en trois :

- **Dépôt de l'échantillon** : On commence par déposer un petit volume (compris entre quelques nano litres et plusieurs microlitres) de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache de 1 à 3 mm de diamètre. Ce dépôt est réalisé avec un capillaire, La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle, au fond de laquelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant.
- **Développement de la plaque** : La phase mobile migre par capillarité à travers la phase

stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Le temps de Migration (plusieurs minutes) dépend de divers paramètres. Quand le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (quelques centimètres), on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.

- **Révélation post-chromatographique** : La localisation des composés après migration se fait sur la plaque débarrassée de l'éluant. Le seuil de détection est influencé principalement par le type de révélation des taches utilisé (lampe ultraviolette, iode, réactifs chimiques spécifiques).



Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM

- **Révélation :**

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes : radiations UV, fluorescence, iode, atomisation.

**Calcul de R<sub>f</sub> (rapport frontal) :**

$$R_f = d_i / d_s$$

Avec :

d<sub>i</sub> : distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache).

d<sub>s</sub> : distance parcourue par le front du solvant.

3.3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

- **Principe :**

Cette méthode permet de séparer du mélange gazeux complexe par une suite continue d'équilibres s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire liquide. Ou parfois solide, placée à l'intérieur de colonne.

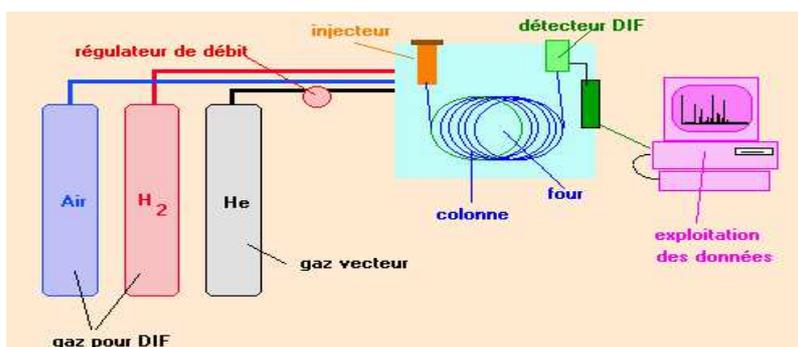
La CPG ne s'adresse pas seulement aux molécules se trouvant naturellement à l'état de gaz mais à tout composé susceptible d'être volatilisé par élévation de la température.

- **Appareillage :**

L'appareil de chromatographie en phase gazeuse comporte trois parties : injecteur, colonne et détecteur à travers lesquelles un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer.

Le gaz vecteur le plus utilisé du LNCM est l'hélium, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être très pur et surtout ne contenir ni oxygène, ni l'eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur.

- **Constituants de l'appareil CPG :**



▪ **Injecteur :** il sert à l'introduire du mélange à analyser dans la colonne.

▪ **Four :** C'est un four à bain d'air, pourvu de résistances chauffantes et d'un système de ventilation et de brassage pour l'homogénéisation de la température.

4. La Spectroscopie Infrarouge :

- **Principe :**

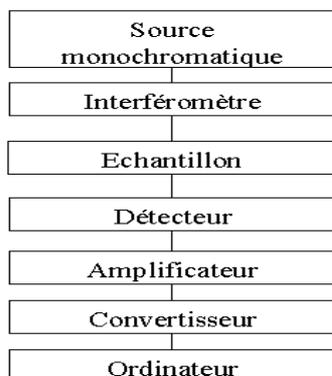
La spectroscopie infrarouge est l'un des outils les plus utilisés pour la caractérisation et l'identification des molécules organiques.

- **Conditions opératoires :**

Pour l'enregistrement des spectres Infrarouge on a utilisé un accessoire spécial qui s'appelle : Unité de Réflexion Totale Atténuée (URTA), les échantillons ne demandent alors aucune préparation préalable, il suffit uniquement de placer une quantité suffisante de l'échantillon sur l'élément de réflexion totale atténuée qui est le cristal de Germanium, puis

appliquer une pression et enfin enregistrer les spectres infrarouges. Le domaine de transparence est entre 4000 et 600  $\text{cm}^{-1}$ .

- **Appareillage :** Appareille utilisé : Tensor 27



Les

éléments principaux d'un spectromètre IR à Transformée de Fourier (FTIR) sont :

- **La source :**

Le choix de la source dépend de la région infrarouge où l'on veut travailler.

- **L'interféromètre :**

Tous les appareils utilisent maintenant un interféromètre de Michelson. Il est constitué de deux miroirs perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, un des miroirs est mobile alors que l'autre reste fixe. Les deux miroirs sont séparés par une séparatrice (lame semi réfléchissante) inclinée de 45°.

Lorsque la radiation atteint la séparatrice, 50% de la radiation est réfléchi sur le miroir fixe et 50% est transmise. Les deux faisceaux sont ensuite réfléchis par le miroir et repartent vers la séparatrice où ils se recombinaient et interfèrent.

On a un phénomène d'interférence, car on a une différence de chemin optique, donc une différence de phase entre les deux faisceaux. Le faisceau résultant traverse l'échantillon et atteint enfin le détecteur.

- **Le détecteur :**

Le détecteur le plus communément utilisé est le détecteur : Deutérium Tryglycine Sulfate.

## 5. Principaux tests galéniques :

Les tests galéniques (pharmaco techniques) occupent une place très importante dans le contrôle de qualité des médicaments, ils assurent avec les tests physique, chimiques et biologiques la qualité, l'efficacité et la sécurité de leurs utilisations.

On peut distinguer trois Principaux tests Pharmaco techniques :

- Test de dissolution

- Désagréations des formes solides
- Résistance à la rupture des comprimés

### 5.1. Test de dissolution des formes solides

#### - Principe et appareillage :

Cet essai est destiné à déterminer la vitesse de dissolution des principes actifs des formes solides (telles que les comprimés, les capsules et les suppositoires) en utilisant un appareil déterminé et dans des conditions opératoires bien définies.

Estimation de la libération du principe actif de sa forme galénique dans le tractus digestif.



#### - Intérêt :

- Connaître la solubilité du Principe Actif (PA)
- Assure la qualité et les performances des produits Pharmaceutiques
- Comparaison des profils de dissolution entre princeps et générique)
- Aide à l'optimisation de la formule et du processus de fabrication

### 6. Méthode de dosage des quantités libérée :

- **Spectrophotométrie** : nature du blanc, cuve, longueur d'onde (cas ou pas d'interférences).

**Remarque** : s'il ya phénomène d'interférences on utilise le système HPLC

- **HPLC** : composition exacte de la phase mobile, type de colonne, sa longueur, diamètre, T°, débit, volume d'injection, longueur d'onde, formule de calcul, normes de dissolution (Q).

Chapitre

4

Partie pratique

---

## **I. Contrôle physico-chimique du Médicament :**

Le travail expérimental effectué au sein du LNCM est porté sur des contrôles physico-chimiques d'une spécialité pharmaceutique (comprimé) à base de **rivaroxaban**.

Le **rivaroxaban** est un médicament anticoagulant oral, inhibiteur du facteur Xa.

### **1. Description du médicament :**

#### **▪ Formes et Présentations :**

Forme : Comprimé pelliculé

Dosage : 15 mg

#### **▪ Indications :**

- Prévention des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et des embolies systémiques chez les patients adultes atteints de fibrillation atriale non valvulaire et présentant un ou plusieurs facteur(s) de risque, tels qu'insuffisance cardiaque congestive, hypertension artérielle, âge  $\geq 75$  ans, diabète.....

#### **▪ Contre indiqué dans les cas suivants :**

- Hypersensibilité rivaroxaban
- Grossesse
- Allaitement

#### **▪ Caractéristiques physico-chimiques de rivaroxaban :**

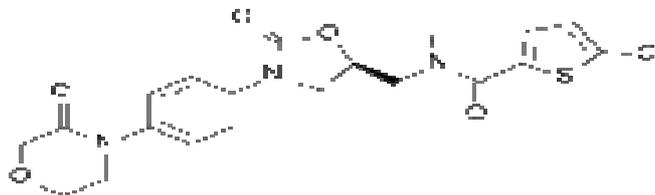
##### **• Identification :**

##### **✓ Nomenclature selon IUPAC :**

(S)-5-chloro-N- {[2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]oxazolidin-5-yl]methyl} thiophene-2-carboxamide

- **Propriétés chimiques :**

- ✓ **Formule chimique développé :**



- ✓ **Formule brute :**



- ✓ **Masse Molaire :**

$$435,881 \pm 0,026 \text{ g/mol.}$$
$$= 435,882 \text{ g/mol}$$

- **Propriétés physiques :**

- ✓ **T° ébullition :**

$$732,609 \text{ }^\circ\text{C à } 760 \text{ mmHg}$$

## 2. Matériels et Réactifs :

- **Réactifs :**

- Acétonitrile, grade HPLC
- Acide o-phosphorique (85%)
- Eau distillée
- Acétate de Sodium
- Acide Acétique
- SDS anhydre
- Hydroxyde de sodium

- **Matériels :**

- Balance
- Ultrason

- pH-mètre
- **Description de l'appareil HPLC utilisé dans l'étude :**



- L'HPLC utilisé pour ce travail est une alliance waters(2695), équipé d'un :
- Détecteur à barrette d'iode (2996)
  - Une pompe quaternaire (2695)
  - Passeur d'échantillons automatique
  - Poste de colonne thermo statée

Le tout est piloté par un logiciel Empower Pro2

### 3. Uniformité de masse :

Ce test se fait sur 20 comprimés qui doivent être pesés individuellement pour déterminer leur masse moyenne puis on trace une carte de contrôle.

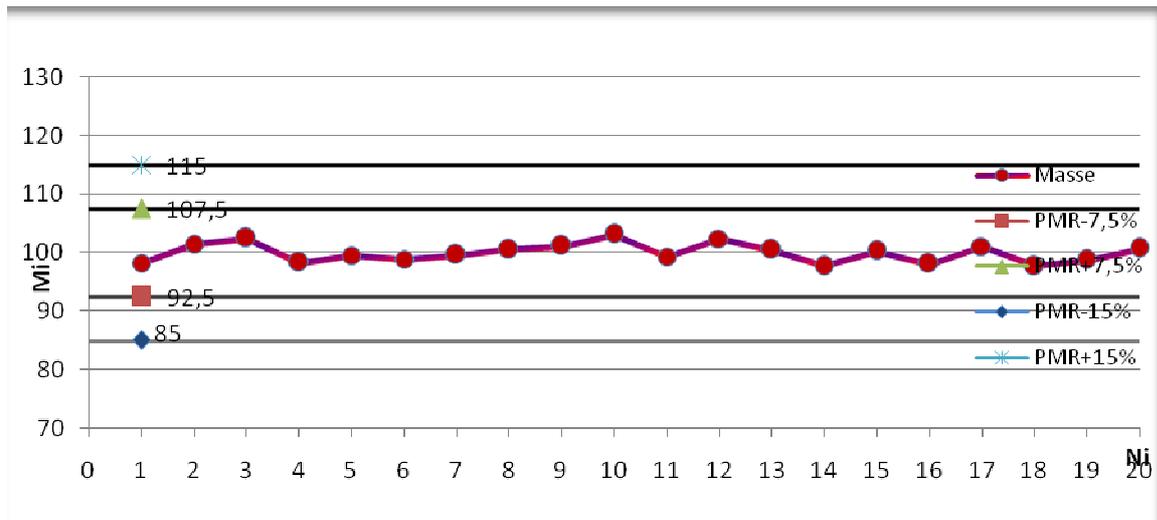
**Les masses ainsi trouvées sont représentées dans le tableau suivant :**

**Tableau 1:Résultats d'uniformité de masse trouvée pour 20 comprimés**

<b>Échantillon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Masse (mg)</b>	<b>86.3</b>	<b>89.2</b>	<b>90.1</b>	<b>86.4</b>	<b>87.5</b>	<b>86.9</b>	<b>87.6</b>	<b>88.4</b>	<b>88.9</b>	<b>90.6</b>
<b>Echantillon</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>Masse (mg)</b>	<b>87.3</b>	<b>90.0</b>	<b>88.3</b>	<b>85.9</b>	<b>88.1</b>	<b>86.2</b>	<b>88.8</b>	<b>85.9</b>	<b>86.8</b>	<b>88.5</b>
<b>MOYENNE</b>					<b>87.89</b>					
<b>NORME</b>					<b>[81.30 - 94.5]</b>					

Toutes les masses des 20 comprimées ; entrent dans les normes du dossier technique ce qui donne des résultats conformes.

• **Résultats et calcul :**



**Figure 1: uniformité de masse des 20 comprimés**

• **Interprétation et conclusion :**

En comparant les masses des comprimés obtenues avec le premier intervalle [85 – 115 mg], On remarque que toutes les masses sont inclus dans cet intervalle. Donc le test est conforme.

**4. Identification et dosage du principe actif (PA) dans le produit fini (PF) par HPLC :**

• **Préparation de la phase mobile :**

La phase mobile dans ce cas d'analyse est un gradient qui comporte deux solutions A et B :

- **A°** Acide o-phosphorique ( $H_3PO_4$  0.01 M)
- **B°** Acetonitrile (ACN)

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	92	8
13	49	51
13.1	92	8

- Préparation du Tampon (Acide o-phosphorique 0.01 M) :

Diluer 11,5 g ou 6,7 ml d'acide o-phosphorique dans 10 litres d'eau purifiée.

▪ Conditions chromatographiques pour le dosage du rivaroxaban dans le PF :

1. Colonne : **Purospher STAR RP-18, (55mm\*4mm)\*3um**
2. Débit : 1.0 ml / min
3. Volume injecté : 5 µl
4. Détecteur : UV 250 nm
5. Température de colonne : 45 °C
6. Durée d'analyse : 13.1 min
7. Mode : Gradient

• Préparation de la phase de dilution :

Tampon / ACN : (1/1.5) (V/V)

❁ **Préparation de standards :**

- On dissout une masse de 42.7 mg (Etalon) dans une fiole de 200 ml
- On complète par la phase de dilution jusqu'au trait de jauge

❁ **Préparation des essais :**

**Mode opératoire :**

- Peser 4 comprimés introduire dans chaque fiole de 250 ml



- On complète par la phase de dilution



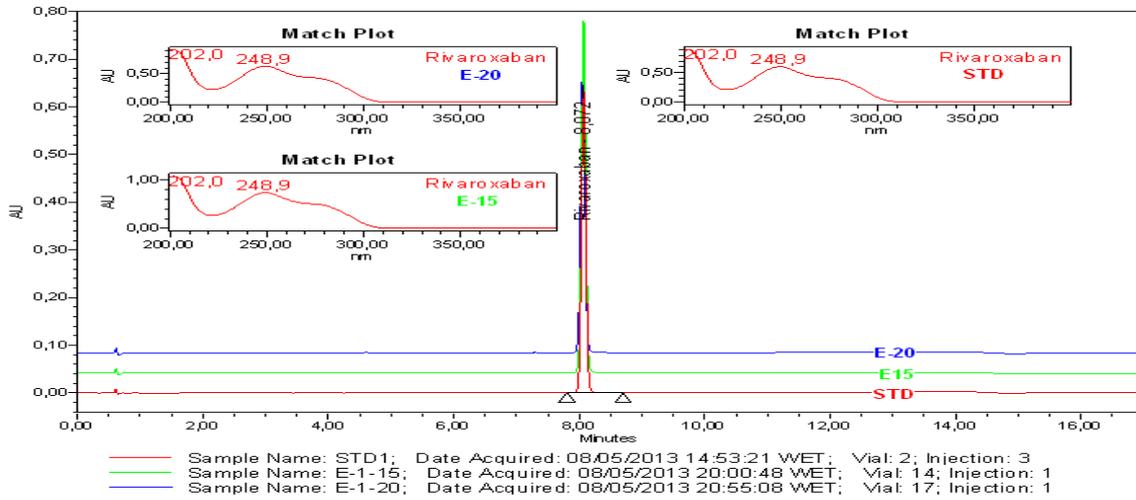
- On met les fioles dans l'ultrason pendant 15 min
- On remplit les vials puis on les injecte dans le système HPLC

ESSAI 1 : 348.1 mg → 250 ml de la phase de dilution

ESSAI 2 : 355.2 mg → 250 ml de la phase de dilution

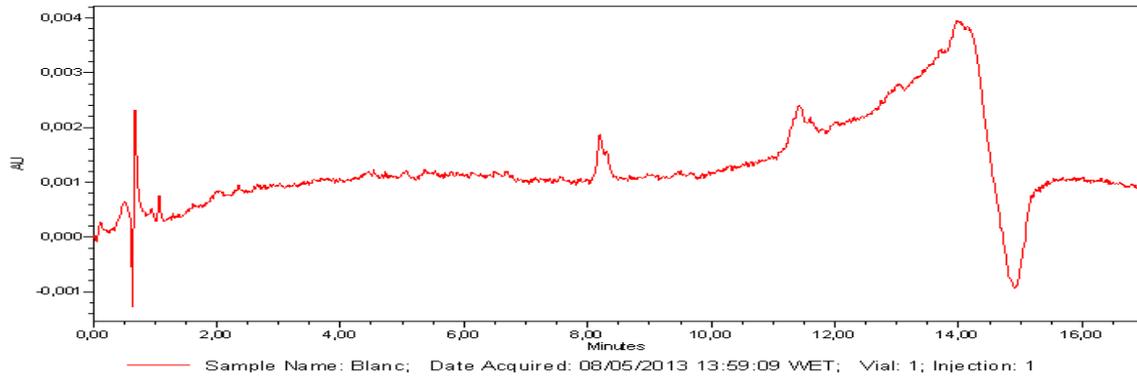
ESSAI 3 : 351.9 mg → 250 ml de la phase de dilution

● Résultats :

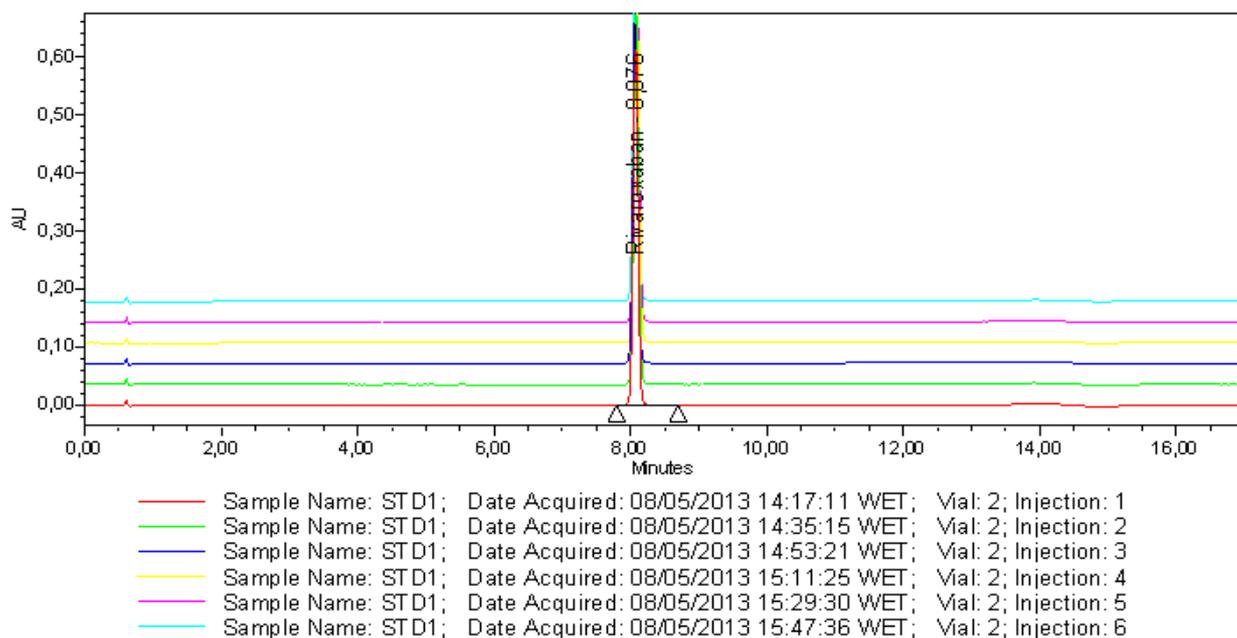


**Figure 1: Chromatogramme d'identification par l'appareil HPLC**

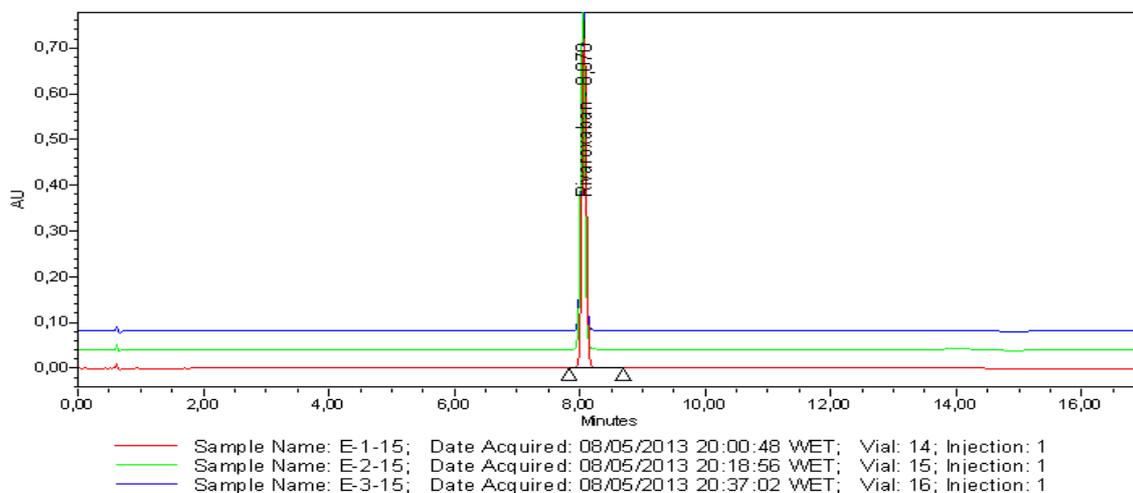
Le blanc est le solvant avec lequel on fait la dilution .



**Figure 3: Chromatogramme de blanc par l'appareil HPLC**



**Figure 4: chromatogramme des standards par l'appareil HPLC**



**Figure 5:Chromatogramme type d'essai des comprimés (15 mg)**

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivant :

**Tableau 2: Résultats de chromatogramme des standards par l'appareil HPLC**

Sample Name	Inj	Temps de rétention (min)	Air
STD1	1	8.076	3198053
STD1	2	8.083	3192499
STD1	3	8.076	3177398
STD1	4	8.090	3159399
STD1	5	8.088	3171519
STD1	6	8.072	3201019

**Tableau 3: Résultats de chromatogramme type d'essai des comprimés (15 mg)**

Sample name	inj	Temps de rétention (min)	Air
ESSAI 1	1	8.070	3597328
ESSAI 2	1	8.048	3614927
ESSAI 3	1	8.052	3620865

**🌟 Calcul :**

En général, la teneur en PA dans une spécialité pharmaceutique est déterminée selon la formule suivante :

$$T \% \text{ en (PA)} = [\text{Air E} / \text{Air(STD)}] * [\text{M(STD)} / \text{ME}] * [\text{Vd.E} / \text{Vd.STD}] * [\text{Pmoy} / \text{T.D}] * [\text{T STD} / 100] [(100 - \text{T eau}) / 100] * 100$$

Avec :

**T(%) :** teneur de PA dans chaque comprimé en pourcentage

**Air E :** air de l'essai

**Air STD :** air du standard

**M(STD) :** la masse du standard

**ME :** la masse de l'essai

**Vd.E :** volume de dilution de l'essai

**Vd.STD :** volume de dilution du standard

**Pmoy :** le poids moyenne des comprimés

**T H<sub>2</sub>O** : le titre en eau du STD

**T.D** : Teneur Déclaré

**Tableau 4: Les données pour calculer la teneur en PA dans les comprimés**

Spécialité	Comprimé de 15 mg de PA
Titre en eau STD (%)	100%
Volume de dilution du STD (ml)	200
Volume de dilution d'essai (ml)	250
Poids moyen (mg)	87.89
Le dosage théorique (mg/comprimé)	15

**Tableau 5: Résultats de dosage de PA dans les comprimés de 15 mg**

Echantillon	Masse (mg)	Aires des pics	Teneur en PA (mg /unité)	(%) Teneur en PA
Étalon 1	42.6	3198053	---	---
Essai 1	348.1	3597328	15.12	100.82
Étalon 1	42.6	31924992	---	---
Essai 2	355.2	3614927	14.92	99.46
Étalon 1	42.6	3177398	---	---
Essai 3	351.9	3620865	15.15	101.03

Moyenne du teneur en PA (mg/unité)	15.07
Moyenne en (%) de la teneur en PA	100.44

**☀ Interprétation et conclusion :**

On remarque dans le chromatogramme d'identification que les temps de rétention du standard et ceux des essais sont sensiblement les même.

Donc on peut conclure que la méthode est spécifique pour l'indentification du PA dans le PF par HPLC.

La moyenne de la teneur en PA est de **15.07 € [14.25-15.75]** dans le produit fini rentre dans les normes de spécification dossier technique.

## 5. Dosage des impuretés de rivaroxaban dans PF par HPLC :

Les impuretés apparaissent pendant la synthèse du principe actif, elles peuvent comprendre les produits de départ et leurs impuretés, des produits de réaction secondaires, d'isomérisation et de dégradation, etc.

Elles devraient être identifiées, qualifiées et étudiées sur le plan toxicologique.

### • Préparation des solutions :

### • Standard :

- On dissout une masse de 20.3 mg du composé (4.5 dichloro Rivaroxaban) dans une fiole de 100 ml ; on complète avec la phase de dilution jusqu'au trait de jauge
- On prélève 2 ml on les met dans une fiole de 200 ml on complète avec la phase de dilution jusqu'au trait de jauge
- On remplit les vials puis on les injecte dans le système HPLC.

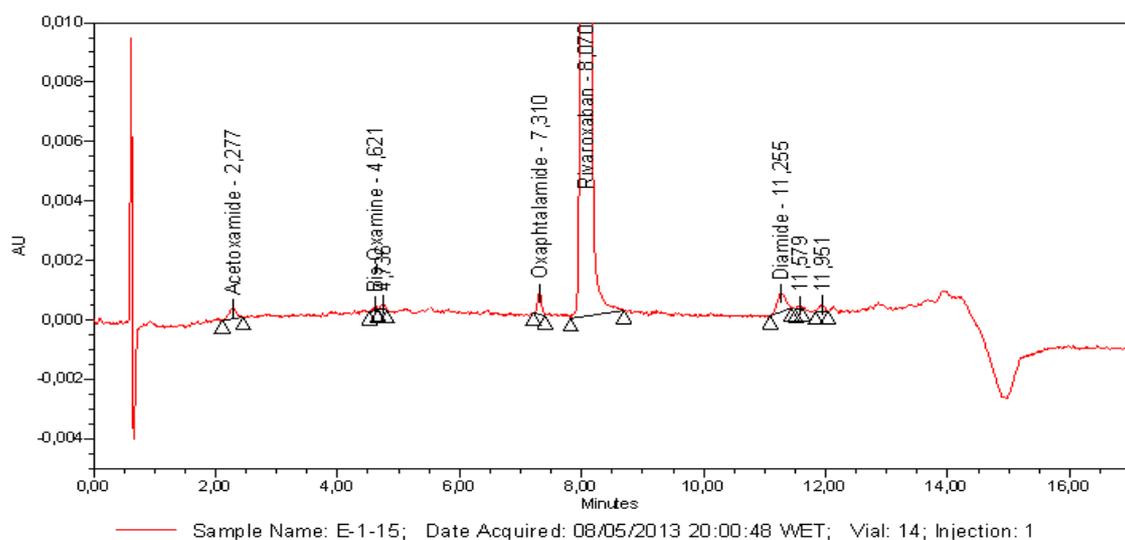
### • Solution à examiner :

#### • Essai 1 :

- On dissout une masse de 348.1 mg dans une fiole de 250 ml ; on complète avec la phase de dilution jusqu'au trait de jauge

#### • Essai 2 :

- On dissout une masse de 355.2 mg dans une fiole de 250 ml ; on



complète avec la phase de dilution jusqu'au trait de jauge.

**Figure 6: chromatogramme de PA et ses imputées (E-1-15)**

**☀ Calcul et résultats :**

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 6: Résultats (d'étalon 1-15) calculés :**

Peak	Peak Name	Temps de rétention (min)	Area	% imp
1	Acetoxamide	2.277	2913	0.08
2	Bis-Oxamine	4.621	540	0.01
3	Diamide	11.255	6003	0.17
4	Oxaphtalamide	7.310	3472	0.10
5	Inc 1	4.736	945	0.03
6	Inc 2	11.579	459	0.01
7	Inc 3	11.951	1396	0.04

**☀ Interprétation :**

Les normes d'impuretés d'après le dossier technique :

**- chaque imp  $\leq 0.2$  %**

**Et  $\xi$  imp  $\leq 0.5$  %**

Les impuretés dans la matière première sont inférieurs aux normes indiquées dans le dossier technique ce qui montre que les résultats sont conformes.

## 6. Test de dissolution :

### ☀ Principe :

Le test de dissolution permet l'évaluation de teneur en PA libre dans un milieu de dissolution pendant 30 min à une température de 37°C plus ou moins 0.5. L'appareil utilisé est un appareil de dissolution à palettes tournantes avec une vitesse de rotation 75 Tr/min.

- Milieu de dissolution :

Tampon pH=4.5+0.4% SDS

10.82g de Sodium Acétate + 9.6 ml d'Acide Acétique + 24g de SDS anhydre dans 6 l d'eau distillée, ajuster le pH a 4.5 avec le NaOH diluée.

pH = 4.48

### ☀ Préparation du Standard :

- On pèse 36 mg d'étalon de travail et l'introduit dans une fiole de 200 ml d'ACN
- Puis en fait une dilution de 2 ml dans 20 ml (milieu de dissolution)
- Filtrer puis lire les Abs à 250 nm et à 300 nm.

### ☀ Préparation des essais :

- On introduit dans chaque récipient 900 ml du milieu de dissolution
- Une fois que la température du milieu se stabilise à 37 °C plus ou moins 0.5, on place un comprimé déjà pesé dans chaque récipient
- A la fin de la dissolution ; prélever 10 ml après 30 min on filtre puis on lit les absorbance à 250 nm et à 300 nm.

**Tableau 7: Masses de chaque comprimé (15 mg)**

	Masse en mg	Abs
<b>STD</b>	--	<b>1.1604</b>
<b>Cp 1</b>	<b>82.2</b>	<b>0.5167</b>
<b>Cp 2</b>	<b>88.3</b>	<b>0.4910</b>
<b>Cp 3</b>	<b>90.3</b>	<b>0.4706</b>
<b>Cp 4</b>	<b>83.8</b>	<b>0.4802</b>
<b>Cp 5</b>	<b>90.2</b>	<b>0.4770</b>
<b>Cp 6</b>	<b>86.7</b>	<b>0.4715</b>

### ❁ Résultats et interprétation :

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau 8: Résultats de la dissolution**

	P. essai (mg)	Abs	Teneur (%)	Normes (%)
STD	36.1	0.7982	--	≥ 80 %
ESSAI 1	82.2	0.6612	96.02	
ESSAI 2	88.3	0.70322	95.06	
ESSAI 3	90.3	0.7467	98.71	
ESSAI 4	83.8	0.6555	93.37	
ESSAI 5	90.2	0.7577	100.27	
ESSAI 6	86.7	0.7188	98.96	

### ❁ Interprétation :

En effet, le pourcentage de la teneur obtenu est supérieur à la norme indiquée par le dossier technique donc le test de la dissolution est conforme.

### 7. Uniformité de teneur :

#### ❁ Préparation des solutions (Standard) :

- On pèse 42.7 mg  $\Rightarrow$  une fiole de 200 ml
- On pèse 42.6 mg  $\Rightarrow$  une fiole de 200 ml

#### ❁ Préparation des essais :

Ce test se fait sur 10 comprimés qui doivent être pesés individuellement.

**Tableau 9: Résultats d'uniformité de teneur trouvée pour 10 comprimés**

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Teneur (%)	98.77	101.08	103.01	104.67	98.22	103.41	99.12	104.76	98.16	102.16
MOYENNE					101.3					

**❁ Interprétation et conclusion :**

Les 10 comprimés ont une teneur de 85 à 115% de la teneur moyenne.

Toutes les teneurs des 10 comprimés ; entrent dans les normes du dossier technique ce qui donne des résultats conformes.

**8. Discussion des résultats :**

Finalement, tous les résultats obtenus suite à l'étude physico-chimique de ce médicament dont le principe actif est rivaroxaban, sont en parfaite concordance avec les limites définies dans le dossier technique. Ceci montre parfaitement que le médicament étudié est conforme et répond à toutes les conditions, ce qui lui permettra d'être commercialisé sur le marché.

*Conclusion générale*

Depuis longtemps la démarche qualité est devenue une priorité dans tous les domaines d'activité, le domaine de la santé publique n'échappe pas à cette évolution. Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments prend toutes les mesures de contrôle pour que l'efficacité et la sécurité des médicaments soient acceptables.

Durant notre stage nous avons participé au contrôle d'une spécialité pharmaceutique (comprimé à base de rivaroxaban). Depuis la matière première jusqu'au produit fini, Les résultats obtenus ont montré que ce comprimé est conforme aux normes fixées dans le dossier technique. Et donc la société pharmaceutique a le droit d'acquérir une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Ce travail nous a permis d'améliorer nos connaissances acquises durant les études que nous avons reçues au niveau de la faculté des sciences et techniques, de développer nos capacités d'initiative et d'autonomie et de s'adapter avec le milieu professionnel. En outre, il nous a permis de bien maîtriser quelques techniques analytiques qui présentent un intérêt majeur dans le domaine pharmaceutique, et surtout d'éclaircir nos visions des exigences du contrôle qualité qui ne se conçoit pas comme un ensemble figé de méthodes expérimentales, mais comme un concept dynamique appelé constamment à évoluer.

## Références bibliographiques

- Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes. Francis et Annick Rouessac. 6<sup>e</sup> édition Dunod 1992.
- Analytical chemistry for technicians. Catherine E. Housecroft et Edwin C. Constable. 3<sup>e</sup> Edition Copyright © 2003 CRC Press LLC.
- Cent manipulations de chimie organique et inorganique. Jacques Mesplède, Christine Saluzzo .Edition Bréal 2004.
- Dossier techniques.

- Procédure d'utilisation des appareils au sein du LNCM.

## Wébographie

- <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>
- [http://www.doctissimo.fr/html/medicaments/articles/sa\\_4044\\_formes\\_galeniques.htm](http://www.doctissimo.fr/html/medicaments/articles/sa_4044_formes_galeniques.htm)
- <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>
- <http://mastervrv.free.fr/cours/S1/PGB/wiki.pdf>
- <http://pca.ujf-grenoble.fr/appareils/spectro/index.htm>