

Année Universitaire : 2018-2019

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Recherche des impuretés dans le médicament Levamox®

Présenté par :

Mme CHRAIBI Chaimae

Encadré par :

Pr. A. MELIANI

Soutenu Le 18 juin 2019 devant le jury composé de :

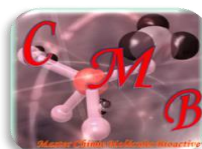
Pr. A. MELIANI

Pr. H. MISBAHI

Pr. H. GRECHE

Stage effectué à : LAPROPHAN MAROC

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom : CHRAIBI Chaimae

Année Universitaire : 2018/2019

Titre : Recherche des impuretés dans les produits pharmaceutiques

Résumé

Le contrôle des différents constituants d'un médicament est une activité de routine pour les laboratoires de contrôle de qualité au sein de l'entreprise LAPROPHAN.

L'évaluation de la conformité se fait selon le protocole de la pharmacopée européenne.

Les substances pharmaceutiques sur lesquelles on a effectué les essais et les dosages ainsi que l'identification des impuretés toxiques ou non toxiques répondent aux normes décrites dans les spécifications données par la Pharmacopée européenne pour le contrôle de la qualité des médicaments.

Mots clés : médicaments, impuretés, antibiotiques.

كلية العلوم والتقنيات فاس
+οϋΣΠοι+ | +CοΘοοισι Λ +ΟΙΣΧΣ+ΣΙ
Faculté des Sciences et Techniques de Fès



جامعة سيدي محمد بن عبد الله
+οΘΛοΠΣ+ ΟΣΛΣ C8ΛCCoΛ ΘΙ ΗΘΛ8ИИoΦ
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Glossaire

A : Amoxicilline

AC : Article de conditionnement

Ac : Acide clavulanique

AMM : Autorisation de mise en marché

CL : Chromatographie liquide

DCI : Dénomination commune internationale

E. Coli : Esherichia.Coli

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

Imp : Impureté

MP : Matière première

PF : Produit fini

Ph.Eur : Pharmacopée Européenne

PSF : Produit semi fini

R.S : Résolution

SCR : Substance chimique de référence

S/N : Signal bruit

T° : Température

Dédicace

A Dieu tout puissant mon soutien éternel de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce projet.

Je dédie ce travail à ;

A **ma mère**, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice, qui m'a encouragé et qui m'a comblé de tout son amour pour avancer dans mes études. Que Dieu la procure bonne santé et longue vie et que ce modeste travail, soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et de vos prières quotidiennes.

A la mémoire de mon père et mon beau père qui nous ont quitté tôt.

A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : Mon Mari **Younes**, tu étais toujours à mes côtés, aucune dédicace ne pourra exprimer mon amour et mon attachement à toi.

A mes sœurs : **Zayneb** et **Fatimazohra** pour leurs encouragements, vous occupez une place particulière dans mon cœur.

A **ma belle-mère** parce qu'il est impossible de trouver les mots qui peuvent exprimer mon amour et ma reconnaissance pour vous.

A ma très chère belle-sœur **Sanaa** et son mari, quoique je dis je ne saurais exprimer l'amour et la tendresse que j'ai pour vous. Je vous remercie pour votre support et vos encouragements, et je vous dédie ce travail, pour tous les moments de joie et bonheur qu'on a pu partager ensemble.

A ma très chère amie **Oumaima** qui m'as beaucoup soutenu et encouragé, en souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble, j'ai le grand plaisir de dédier à toi ce modeste travail.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Remerciement

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme **N. LAHJOURI**, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel.

Mes remerciements s'adressent à mon encadrant **Mr A. MELIANI** pour son aide pratique et son soutien moral et sa disponibilité durant notre préparation de ce travail.

Je remercie aussi tout le personnel du laboratoire de contrôle de qualité pour leur disponibilité et mes plus profonds remerciements vont à Mme **N.**

ELHASKOURI et Mr **H. ASLAMA** pour leurs aides, encouragement et d'avoir partagé leurs expériences professionnelles avec moi ainsi que leurs connaissances.

Mes remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles. Ainsi que les membres des jurys d'avoir accepté de juger ce travail.

Bibliographie

- (1) <http://www.laprophan.com>
- (2) https://www.sciences-en-ligne.com/DIST/Data/Ressources/lic2/chimie/chi_gen/spectro/ir/spectro_ir
- (3) Extrait de cours de pharmaco-chimie étudié en M1, master CMBA, Mme. MISBAHI, 2019
- (4) Livre de pharmacologie et thérapeutiques © 2015, Elsevier Masson SAS. Tous droits Réservés (p. 47-56)
- (5) [https://www.sci-hub.tw/10.1016/S1769-7344\(05\)70089-5](https://www.sci-hub.tw/10.1016/S1769-7344(05)70089-5)
- (6) <https://www.doi.org/10.1016/j.puroi2016.05.002>

Table de matière

Introduction générale	1
Chapitre I : Présentation générale de l'organisme de travail	2
I. Laboratoire Laprophan de contrôle de qualité :	3
I.1 Les sections de laboratoire de contrôle :	3
I.2 Contrôle de la matière première :	4
I.3 Contrôle du produit fini :	6
I.4 Contrôle des produits en cours de Fabrication :	7
Chapitre II : Etude bibliographique	8
I. Présentation d'un médicament :	8
I.1 Définition :	8
I.2 Formulation d'un médicament :	8
I.3 Les formes pharmaceutiques :	10
I.4 Principaux causes d'altération des médicaments :	10
II. Les antibiotiques et leurs mode d'action :	11
II.1 Définition :	11
II.2 Historique :	11
II.3 Modes d'action des antibiotiques :	12
II.4 Choix de l'antibiotique :	12
II.5 Choix de la voie d'administration :	13
II.6 Familles d'antibiotiques utilisés en thérapeutique :	13
III. Axymicine® :	17
IV. Critères de pureté et d'identité :	20
1. Critères organoleptiques :	20
2. Critères physiques :	20
3. Les critères chimiques :	20
4. Les Critères chromatographiques :	21
5. Critères spectraux :	22
V. Recherche des impuretés dans des principes actifs :	23
V.1 Classification des impuretés :	23
V.2 Critères de qualification et contrôle des impuretés :	23
V.3 Méthodes d'analyses :	24
V.4 Impuretés à inclure dans les substances médicamenteuses :	24
V.5 Qualification des impuretés :	25
VI. Recherche des impuretés dans les produits médicamenteux existants :	25

VI .1 Critères de Déclaration des Produits de Dégradation :	25
VI.2 Méthodes d'analyses :	26
VI .3 Déclaration du Contenu de Produits de Dégradation des Lots :	26
VI.4 Énumération des Produits de Dégradation dans les Spécifications :	27
VI.5 Qualification des Produits de Dégradation :	27
VI.6 Substance chimique de référence :	27
Chapitre III : Partie expérimentale	28
I-Objectif :	28
II. Instrumentation :	29
II-1 Chromatographie liquide à haute performance HPLC :	32
II.2 Spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge (IR) :	33
II.3 Titracteur Karl Fischer :	34
II.4 Appareil de désagrégation :	34
III- Méthodes et discussions	
A- CONTROLE DE QUALITE DE LA MATIERE PREMIERE	31
I. Principe actif : AMOXICILLINE trihydratée. (C₁₆H₁₉N₃O₅S, 3H₂O)	31
I.1 Contrôle organoleptique :	32
I.2 Identification :	32
I.3 Détermination du pH et dosage de la teneur en eau :	33
I.4 Substances apparentées et dosage de l'amoxicilline trihydratée :	33
II. Principe actif : ACIDE CLAVULANIQUE	38
II.1 Contrôle organoleptique :	38
II.2 Identification :	38
II.3 Détermination du pH et dosage de la teneur en eau :	38
II.4 Substances apparentées et dosage de l'acide clavulanique :	39
B- CONTROLE DU PRODUIT FINI	46
I. Contrôle organoleptique	46
II. Masse moyenne expérimentale	46
III. Dosage de l'Axymicine	46
IV. Substances apparentées de l'Axymicine	49
Conclusion générale	53

Chapitre I : Présentation générale de l'organisme de travail

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux antibiotiques de la classe des pénicillines.	14
Tableau 2 : Résultats de conformité du système (solution témoin b) des substances apparentées	35
Tableau 3 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution essai des substances apparentées	35
Tableau 4 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution témoin (c) des substances apparentées	36
Tableau 5 : Résultats des surfaces de la répétabilité du témoin (a) lors du dosage de l'amoxicilline ..	37
Tableau 6 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) lors du dosage de l'amoxicilline ...	37
Tableau 7 : Résultats de conformité du système (solution témoin b) des substances apparentées	40
Tableau 8 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution témoin (a) des substances apparentées	41
Tableau 9 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution essai des substances apparentées	42
Tableau 10 : Résultats de conformité du système (solution témoin b) lors du dosage.....	44
Tableau 11 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution essai lors du dosage	45
Tableau 12 : Résultats des surfaces de la répétabilité du témoin (a) lors du dosage.....	45
Tableau 13 : Résultats de mesures des surfaces de la solution à examiner lors du dosage	48
Tableau 14 : Résultats de conformité du système (solution de référence (3)) des substances apparentées	50
Tableau 15 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution à analyser des substances apparentées	51

Liste des figures

Figure 1 : Organigramme des opérations pharmaceutiques.	2
Figure 2 : Circuit d'analyse des matières premières (MP) et articles de conditionnement.	4
Figure 3 : Analyse des produits finis (PF) et des produits semi-finis (PSF).	6
Figure 4 : Formule chimique de la pénicilline.....	14
Figure 5 : Formule chimique de l'aminopénicilline.....	15
Figure 6 : Formule chimique de l'ampicilline	15
Figure 7 : Formule chimique de l'amoxicilline.....	16
Figure 8 : Amoxicilline et acide Clavulanique	17
Figure 9 : HPLC WATERS ALLIANCE e2695	29
Figure 10 : PERKIN ELMER SPECTRUM 100.	30
Figure 11 : Appareil Titrateur volumétrique Karl Fischer METTLER TOLEDO DL 38.	30
Figure 12 : Appareil de désagrégation.	31
Figure 13 : Spectre IR de l'amoxicilline trihydratée.	32
Figure 14 : Chromatogramme de la solution témoin (b) des substances apparentées.	34
Figure 15 : Figure 10 : Chromatogramme de la solution Essai des substances apparentées.	35
Figure 16 : Chromatogramme de la solution témoin (c) des substances apparentées.	35
Figure 17 : Chromatogramme de la solution Essai lors du dosage de l'amoxicilline.....	37
Figure 18 : Chromatogramme de la solution témoin (b) des substances apparentées.....	40
Figure 19 : Chromatogramme de la solution témoin (a) des substances apparentées.....	40
Figure 20 : Chromatogramme de la solution essai des substances apparentées.....	41
Figure 21 : Chromatogramme de la solution témoin (b) lors du dosage.	44
Figure 22 : Chromatogramme de la solution Essai lors du dosage.....	45
Figure 23 : Chromatogramme de la solution de référence lors du dosage.....	47
Figure 24 : Résultats de mesures des surfaces de répétabilité de la solution de référence lors du dosage.....	48
Figure 25 : Chromatogramme de la solution à examiner lors du dosage.	48
Figure 26 : Chromatogramme de la solution de référence (3) des substances apparentées.	50
Figure 27 : Chromatogramme de la solution à analyser des substances apparentées.	51

Chapitre II : Etude bibliographique

Chapitre III : Partie expérimentale

Introduction générale

Les antibiotiques sont des médicaments antibactériens d'origine naturelle, produits à partir des champignons ou des bactéries ou obtenus par synthèse ou semi-synthèse. Ils ont en principe une toxicité sélective, c'est à dire qu'ils sont toxiques pour les bactéries mais non pour l'organisme ; ce qui malheureusement n'est pas toujours vrai.

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la mise sur le marché d'un nouvel antibiotique est rarement retardée pour un problème de toxicité ou d'effet indésirable. Une enquête réalisée entre 1964 et 1985 dans sept laboratoires pharmaceutiques britanniques a montré que les causes principales d'arrêt de développement sont liées à un manque d'efficacité ou à des problèmes pharmacocinétiques.

Plusieurs molécules antibiotiques sont donc retirées du marché pour des effets indésirables certes souvent très grave, voire mortels, à cause de la présence de plusieurs substances apparentées. Il est impératif donc de rester vigilant et de continuer à surveiller la tolérance de ces molécules dans le long terme.

Au cours de mon stage nous nous sommes intéressées à l'identification de ces impuretés dans les médicaments, en particulier à l'**Axymicine**[®].

Ce produit composite contenant de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique appartient au groupe de médicaments appelés *antibiotiques*. Il s'utilise pour **soigner les infections causées par certaines bactéries**. L'amoxicilline agit en tuant les bactéries responsables de l'infection. L'acide clavulanique aide à rendre l'amoxicilline plus efficace. Ce médicament est généralement indiqué dans le traitement d'infections qui siègent dans les sinus, l'oreille, le poumon, la peau et la vessie.

En effet on a étudié la teneur du principe actif ainsi que la recherche des substances apparentés ou proprement dit les impuretés et leurs types qu'on peut trouver dans ce médicament pour vérifier s'ils respectent les normes de la pharmacopée européenne, son utilité est de voir la robustesse de la formulation, la résistance du P.A dans la production (humidité, température, interaction des excipients) et si le taux de dégradation dépasse les 20% on passe alors au contrôle de la toxicité et l'évolution de cette dégradation en fonction du temps.

Cette problématique induit ce sujet qui est subdivisé en 3 parties :

Chapitre I : Présentation générale de l'organisme de travail

Chapitre II : Etude bibliographique

Chapitre III : Parti expérimentale

LAPROPHAN S.A est depuis sa création en 1949, l'un des phares de la dimension industrielle pharmaceutique du Maroc, et ce dans le cadre des Plans Nationaux et des Hautes Directives Royales de développement économique du Maroc.

LAPROPHAN S.A. avec son usine modèle de 23.000 m², à Casablanca, est devenu le premier producteur en unités et le premier laboratoire national au Maroc grâce aux orientations et à l'impulsion qui lui sont données par son Président feu Monsieur ABDERRAHIM BENNIS, Pharmacien Biologiste, Diplômé de l'I.P.I. de Paris. Les structures scientifiques mises en place, notamment dans le domaine des contrôles, placent LAPROPHAN S.A. au meilleur niveau international. De plus, LAPROPHAN.SA a lancé en exploitation depuis février 2004 son nouveau Centre de Distribution intelligent doté des nouvelles technologies de l'information et de logistique. Cet investissement, étalé sur une superficie de 13 000 m² et d'une valeur estimée à plus de 10 millions de Dollars USD, a pour principal objectif l'amélioration de la qualité de service relative à la distribution des produits pharmaceutiques au niveau national et international.

La "GAMME LAPROPHAN" développée et mise au point dans le cadre de sa société filiale de recherches et d'applications galéniques, en liaison avec les universités et hôpitaux marocains et étrangers, autorise LAPROPHAN S.A. à répondre à la majorité des demandes thérapeutiques avec près de 200 Médicaments fabriqués qui bénéficient d'innovations continues. Les performances de LAPROPHAN S.A., témoignent d'une croissance annuelle de l'ordre de 10 à 15% sont non seulement le fait de ses moyens matériels sophistiqués mais surtout de la dynamique propre de son encadrement pharmaceutique, technique, administratif et commercial de très haut niveau. L'ensemble du personnel de LAPROPHAN S.A. 800 personnes bénéficie d'une formation continue Contribuant largement à la promotion individuelle.

LAPROPHAN S.A. développe un réseau national et international de relations publiques à l'écoute et au service du corps médical, tant au Maroc que dans plusieurs pays étrangers où LAPROPHAN S.A. exporte ses médicaments ⁽¹⁾.

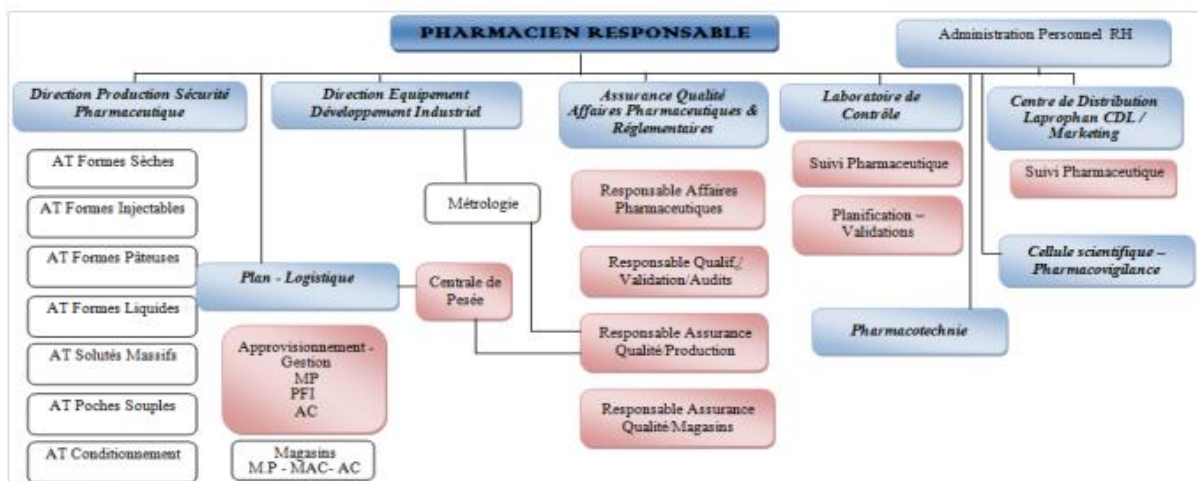


Figure 1 : Organigramme des opérations pharmaceutiques.

Le contrôle de qualité fait partie des bonnes pratiques de fabrication, il concerne l'échantillonnage des spécifications du contrôle ainsi que les procédures d'organisation de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectués et que les matières premières des articles de conditionnement et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été satisfaisante ceci que leur réalisable que si la société dispose d'un laboratoire bien équipé en matériel d'analyse et avec un personnel organisé compétent et responsabilisé.

Pour que l'industrie pharmaceutique garantisse la sécurité, l'efficacité et la qualité de ses produits mis sur le marché, il faut qu'elle dispose d'un laboratoire de contrôle qualité actif et efficace assurant les différents contrôles nécessaires :

I. Laboratoire LAPROPHAN de contrôle de qualité :

I.1 Les sections de laboratoire de contrôle :

Section prélèvement : Elle est chargée de l'échantillonnage des matières premières, de l'examen visuel préliminaire des contenants à échantillonner, de l'identification de l'état de contrôle des matières premières, de la réception, de l'enregistrement des échantillons des produits finis pour le contrôle, le classement des échantillons débloqués et de l'identification des échantillons témoins.

Section physico-chimie : Elle est équipée de matériel d'analyse nécessaire pour effectuer les contrôles physico-chimiques pour l'analyse des matières premières des produits finis ou ceux en-cours de fabrication.

Section bactériologie : Elle permet d'effectuer les contrôles bactériologies : contrôle stérilisé. Contrôle propreté. Une animalerie est rattachée à cette section pour le contrôle des pyrogènes.

Section CAC : Elle s'occupe du contrôle des articles de conditionnement des produits finis avant libération.

Secrétariat technique : Edite les étiquettes informatisées, les bulletins d'analyse et s'occupe du classement des dossiers de fabrication des produits et d'archivage.

I.2 Contrôle de la matière première :

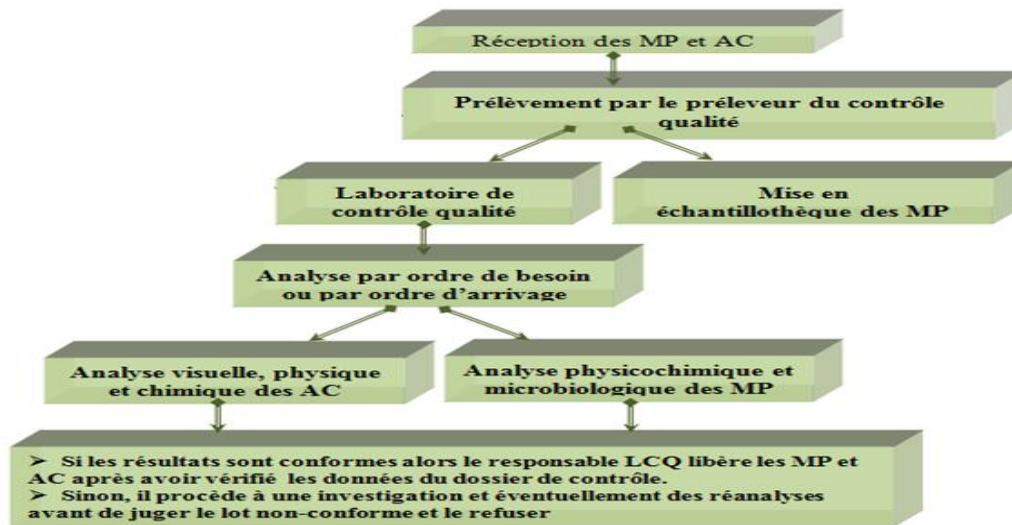


Figure 2 : Circuit d'analyse des matières premières (MP) et articles de conditionnement.

Le contrôle de la matière première se fait suivant des fiches techniques établies à partir de la pharmacopée européenne ou suivant des spécifications du fournisseur.

✚ Réception de la matière première :

Les matières premières sont commandées par le service AT.PL « Approvisionnement transit planning logistique » à la réception d'une matière première MMP « Magazine matière première » oppose sur chaque contenant deux étiquettes

- Une étiquette rouge : comportant les désignations :
 - non prélevé
 - ne pas utiliser
 - non contrôlé

➤ Une étiquette informatique désignant la matière première, son code spécifique, le Numéro de lot LAPROPHAN, le numéro de lot de fournisseur et le numéro de contenant.

✚ Échantillonnage :

Les prélèvements d'échantillon sont effectués selon des procédures écrites et approuvées. Deux types de prélèvements sont réalisés :

- Un prélèvement pour le contrôle physico-chimie.
- Un prélèvement pour le contrôle bactériologique.

Le préleveur au moment du prélèvement masque la désignation « NOM ».

Une étiquette éditée par le système informatique portant les indications suivantes :

- Désignation produit
- Code de produit -Numéro d'arrivage
- Numéro de lot de fournisseur -Numéro de commande -Numéro de contenant
- Quantité /nombre de contenants -Pastille bleue
- Date d'arrivage
- Nom de fournisseur.

Le contrôle :

Le technicien de laboratoire contrôle le produit qui lui a été planifié, en se référant à la fiche technique appropriée établie à partir de la pharmacopée européenne en suivant des spécifications fournisseur.

Le contrôle se base sur quatre axes principaux

Caractères organoleptiques : C'est une caractérisation concernant la couleur, l'odeur et la granulométrie de la matière première qui permet de vérifier la conformité par rapport à un témoin déjà accepté et suivant la fiche technique correspondante aussi des tests de solubilité.

Identification : permet de reconnaître la matière première, elle se fait par :

- Des réactions chimiques qui sont souvent sélectives.
- Des réactions d'absorption dans l'UV-Visible.
- Des spectres d'infrarouge.
- Chromatographie sur couche mince.

Les essais : Ils sont effectués sur des échantillons moyens et permettent de caractériser la substance contrôlée (conductivité, pouvoir rotatoire, pH, viscosité.....), de déterminer un titre (taux de matière minérale par cendres ou taux d'humidité par perte à la dessiccation, ou la densité relative de la substance), ou la quantité des constituants mineurs ou étrangers qui peuvent influencer sur l'activité de la substance et induire aussi à des effets indésirables et même toxiques (essais limites des constituants inorganiques).

Les méthodes de dosage : Elles permettent de déterminer avec précision le titre ou la pureté de la substance chimique. Elles sont soit manuelles ou instrumentales.

- Dosage volumétrique : basé sur l'utilisation des solutions titrées qui réagissent avec la substance à doser. Il peut être direct ou en retour. Les points d'équivalence sont déterminés soit visuellement (Indicateurs colorés) soit par potentiomètre.
- Dosage gravimétrie.
- Dosage par HPLC.
- Dosage par spectrophotométrie.

Débloccage : Après contrôle, le technicien enregistre les résultats trouvés sur son cahier de contrôle de matière première et sur le bulletin d'analyse et les transmet au pharmacien qui effectue les vérifications nécessaires et donne sa décision d'acceptation ou de refus.

Si la matière première est acceptée, le préleveur masque les désignations « Ne pas utiliser », et « Non contrôlé » par l'étiquette « Acceptée ». Dans le cas contraire, le préleveur masque l'étiquette « Refusée » sur laquelle une pastille rouge est collée.

Pour les lots de matière première conforme, le technicien transmet deux échantillons représentatifs au service prélèvement ;

- Un pour l'expertise dont la qualité est suffisante pour effectuer trois compléments.
- Un qui va servir de témoin pour le contrôle.

Le reste des échantillons déjà contrôlés sera transmis au service prélèvement pour la destruction avec une fiche qui indique : Désignation du produit, Code, Numéro d'arrivage, Nombre de prélèvements.

I.3 Contrôle du produit fini :

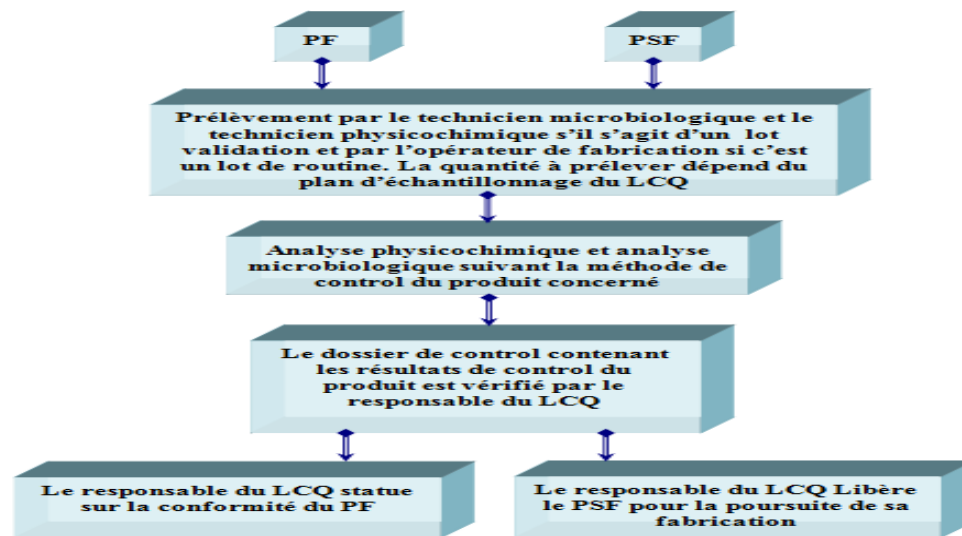


Figure 3 : Analyse des produits finis (PF) et des produits semi-finis (PSF).

✚ Prélèvement :

A la fin de la fabrication d'un produit, l'atelier livre un échantillon du produit accompagné du dossier de fabrication à la section prélèvement, en vue de le contrôler.

✚ Le contrôle :

La section de prélèvement transmet au technicien de laboratoire de contrôle des échantillons du produit fini qui peut être sous l'une des formes suivantes :

- Forme liquide : sirop, ampoule buvable.....
- Forme pâteuse : Pommade, crème.....
- Forme sèche : comprimés, poudre, et granulés.....
- Forme injectable : solvants injectables, solutés massifs...

Le contrôle du produit fini porte sur les rubriques suivantes en principe :

- Caractérisation
- Détermination du poids et volume.
- Identification du premier actif ou excipients.
- Dosage des principes actifs.
- Autres : Désagrégation, perte de masse, pH

Les contrôles sont réalisés selon les fiches techniques appropriées et les résultats obtenus sont enregistrés sur les cahiers de laboratoire au fur et à mesure de l'avancement du contrôle. Ils sont reportés ensuite sur des bulletins d'analyse de couleur blanche.

✚ Déblocage du produit fini :

A la fin du contrôle, l'ensemble des documents de fabrication et de contrôle sera vérifié et transmet au chef du laboratoire pour donner sa décision finale.

Les échantillons des produits finis acceptés seront classés par la section prélèvement dans une échantillothèque, le reste des échantillons contrôlés sera ensuite détruit.

NB : Les Produits Finis (PF) sont libérés par le Pharmacien responsable après vérification de leur dossier de contrôle par l'assurance qualité.

I.4 Contrôle des produits en cours de Fabrication :

Pour garantir un bon déroulement de la fabrication, avec des produits conformes, des contrôles en cours de fabrication ont été établies. Ils permettent de prévoir les anomalies en fabrication et ainsi de prendre les mesures nécessaires et de mettre en œuvre les actions correctives remédiant ainsi à tout problème de non-conformité détectée.

Les contrôles les plus courants sont :

➤ **Soluté massif :**

Dosage de principe actif : soit volumétrique ou par polarimétrie.

Contrôle du pH.

➤ **Forme liquide :**

Dosage volumétrique du principe actif.

Densité.

Indice de réfraction.

➤ **Forme injectable :**

Contrôle du pH.

Contrôle du volume.

I. Présentation d'un médicament :

I.1 Définition :

Médicament : un médicament est un mot masculin d'origine latine (Medicamentum) dans la première apparition date de 1314. Il est défini comme « une substance employée pour traiter une affection ou une manifestation morbide ». Le Code de la Santé Publique (CSP) nous donne une définition plus précise « On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventive à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administrée à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leur fonction organique ».

- ✓ **Princeps :** ou médicament de référence 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) selon l'AMM.
- ✓ **Générique :** le générique est un médicament ayant la même composition qualitative et quantitative en principes actifs qu'une spécialité de référence.

Chaque médicament est défini par le nom chimique de son principe actif, la dénomination commune internationale (DCI) et plusieurs noms de marque également appelés nom de fantaisie ⁽³⁾.

I.2 Formulation d'un médicament :

Un médicament comporte essentiellement :

- ✓ **Principe actif :** Tout composant d'un médicament qui est destiné à exercer une action pharmacologique ou un autre effet direct en rapport avec le diagnostic, le traitement ou la prévention d'une maladie, ou à agir sur la structure ou les fonctions de l'organisme humain ou animal par des moyens pharmacologiques. Un médicament peut contenir plusieurs principes actifs.

Différentes origines pour les produits actifs :

Végétale :

- Préparations à bases de plantes
- Substances chimiques définies et isolées des plantes, obtenues par extraction et purification

Animale :

- Foie pour traiter les anémies
- Venins de batraciens contiennent de la dermaseptine antiseptique.

Minérale :

- Bicarbonate de sodium : correcteur de pH pour l'acidité gastrique
- oxyde de zinc et sulfate de cuivre : antiseptiques

Microbiologique :

- Produits élaborés par les micro-organismes cultivés en milieu liquide
- Chloramphénicol : traitement des infections urinaires

Synthétique :

- Synthèse d'un analogue structural
- Synthèse d'un agent bloquant un récepteur spécifique

Marine :

- Polymères marins
- Extraits protéiques comme les crevettes

✓ **Excipient :** Tout composant, autre que le(s) principe(s) actif(s), qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication. La fonction d'un excipient est de servir de vecteur (véhicule ou base) au(x) principe(s) actif(s), ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du produit telles que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication. La formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients.

Les rôles des Excipients :

- Stabiliser un principe actif : liants, diluants, conservateurs
- Solubiliser (par exemple substance hydrophobe dans une huile)
- Permettent de cibler une zone précise de l'organisme
- Lui donner une forme (gélule, suppositoire, gel, goutte, liquide, comprimé)
- Améliorer le goût du médicament administré par voie orale et améliorer la conservation

Grandes familles des excipients utilisées :

Hydrophiles :

- L'eau : L'eau potable, l'eau purifiée
- Les alcools : L'éthanol, le glycérol
- Les agents gélifiants : Les protéines, la cellulose et ses dérivés

Lipophiles :

- Les glycérides : Les glycérides d'origine naturelle, les glycérides hémissynthétiques
- Non glycérides : Les acides gras, les hydrocarbures

Emulsionnants :

- Les tensioactifs anioniques : Les savons, les dérivés sulfatés
- Les tensioactifs cationiques : Chlorure de benzododécinium, chlorure de benzalkonium
- Les tensioactifs amphotères : L'imidazoline
- Les tensioactifs non ioniques : Les glycérides, les esters non glycérides

Les sucres et dérivés :

- Le glucose
- Les amidons
- Le sucre blanc officinal ou saccharose

Les agents gélifiants :

- Les silices colloïdales
- Le talc
- L'oxyde de titane

I.3 Les formes pharmaceutiques :

La forme pharmaceutique d'un médicament s'appelle aussi sa forme galénique. La forme pharmaceutique doit permettre une administration simple du médicament, avec une posologie précise et garantir une stabilité physicochimique du médicament la plus longue possible. Bien évidemment la forme pharmaceutique doit être adaptée au traitement d'une maladie déterminée. Une voie d'administration peut avoir plusieurs formes pharmaceutiques qui lui correspondent.

On trouve ;

- **Les comprimés :** Ce sont des préparations de consistance solide, de formes diverses (ovales, ronds, ...)
- **Les gélules :** Ce sont de petites boîtes cylindriques constituées de deux enveloppes rigides en gélatine s'emboîtant l'une dans l'autre et contenant une poudre médicamenteuse
- **Les sirops :** Ce sont des préparations liquides contenant une forte proportion de sucre et destinées à être avalées
- **Les suspensions :** Ce sont des poudres contenues dans un flacon Avant utilisation, le malade ajoute un volume précis d'eau propre puis il dissout correctement la poudre en agitant fortement le flacon
- **Les pommades :** ce sont des préparations de consistance molle, destinées à être appliquées sur la peau ou les muqueuses
- **Les collyres :** Ce sont des médicaments destinés au traitement des maladies oculaires. Ces préparations stériles sont appliquées directement sur l'œil
- **Les préparations injectables :** ce sont des solutions ou des poudres que l'on dissout avant l'administration au patient. Ces produits sont destinés à être injectés à travers la peau.

I.4 Principales causes d'altération des médicaments :

- **La température :**
 - Accélère et favorise toutes les réactions chimiques.
 - Peut provoquer des changements d'état physique.
 - Modifie des caractères organoleptiques.
 - Favorise le développement des microorganismes.
 - Facilite l'évaporation des solvants.

- **La lumière :**

Surtout les rayons UV, provoquent des transformations moléculaires, dépolymérisations ou décompositions.

- **L'air atmosphérique :**

Principale agent : oxygène

- **L'humidité :**

Elle accentue les autres altérations.

- **La contamination microbienne**

- **Les manipulations de fabrication brutales :**

Granulation, broyage, compression ⁽³⁾.

II. Les antibiotiques et leurs mode d'action :

II.1 Définition :

Les antibiotiques sont des substances chimiques, élaborées par des micro-organismes ou par synthèse chimique, capables d'inhiber la multiplication (bactériostatique) ou de détruire (bactéricide) des bactéries. Les antibiotiques ont pour but de diminuer ou de stabiliser la quantité de bactéries présentes au niveau du site infectieux et d'aider les cellules du système immunitaire à entamer le processus de guérison. L'utilisation effrénée des antibiotiques chez l'homme et l'animal a créé une pression de sélection sur les bactéries et a favorisé l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques. Ceci est un véritable problème de santé publique. Il est donc essentiel d'utiliser les antibiotiques uniquement quand cela est nécessaire, de privilégier les antibiotiques à spectre étroit et de respecter les durées de prescription. Le traitement antibiotique doit parfois être associé à un acte chirurgical pour éradiquer complètement l'infection ⁽⁴⁾.

II.2 Historique :

Les premières recherches orientées vers la découverte des médicaments antibactériens ont été menées dans deux directions : la voie chimique et la voie biologique. La voie chimique qui a consisté à trouver par voie de synthèse chimique des antiseptiques à toxicité sélective n'a pas connu de grands succès. La voie biologique a été pratiquement le point de départ de l'ère des antibiotiques. Elle a consisté à découvrir des produits utilisables parmi les substances antimicrobiennes produites par les micro-organismes. Pasteur et Joubert constatèrent en 1887 un antagonisme entre le bacille du charbon et d'autres bactéries. Pasteur émit l'idée qu'il serait possible d'obtenir des médicaments antimicrobiens à partir de cet antagonisme. Ils furent suivis par d'autres tels que Dachynes qui aboutit aux mêmes conclusions la même année.

Mais l'ère véritable des antibiotiques ne s'ouvrit qu'avec la découverte de la pénicilline par Alexandre FLEMING en 1929 ⁽⁴⁾.

C'est en 1940 qu'une équipe de chercheurs d'Oxford Foley, Chain et Meatley réussit à obtenir une pénicilline concentrée, partiellement purifiée et stable. Elle fut employée pour traiter des septicémies à staphylocoques et la méningite intrarachidienne. Après le succès de la pénicilline plusieurs antibiotiques furent successivement découverts.

C'est ainsi qu'en 1939, Dubos extrait la tyrothricine à partir du *Bacillus* sp, mais elle était trop toxique pour être utilisée par voie générale. En 1944, Selman Abraham Waksman découvrit avec Scharz et Bugie la streptomycine à partir d'un *Streptomyces*. Ils l'utilisèrent contre la tuberculose. En 1947 les polymyxines ou aerosporines furent isolées d'une bactérie du genre *Bacillus* sp par deux groupes de chercheur.

En 1948, deux antibiotiques importants à spectre large furent isolés du genre *Streptomyces*. Le chloramphénicol par Ehrlich était le premier antibiotique actif contre la fièvre typhoïde et la chlortétracycline ou aureomycine par Duggar qui fut suivie en 1949 de l'oxytétracycline. En 1950, la colistine fut isolée L'érythromycine et la vancomycine furent découvertes en 1956, la kanamycine en 1957. La gentamycine fut isolée en 1963 à partir d'un champignon du genre *Microsporium* la lincomycine en 1967 fut également extraite du genre *Streptomyces* ⁽⁴⁾.

II.3 Modes d'action des antibiotiques :

Les 4 principaux modes d'actions des antibiotiques sont :

- Inhiber la synthèse de la paroi bactérienne, c'est-à-dire inhiber la synthèse du peptidoglycane ;
- Inhiber la synthèse de la membrane cytoplasmique ;
- Inhiber la synthèse de l'ADN bactérien ;
- Inhiber la synthèse de protéines bactériennes ⁽⁴⁾.

II.4 Choix de l'antibiotique :

Pour traiter efficacement une infection bactérienne il faut administrer au patient un antibiotique :

- Dont le spectre d'activité est actif sur la bactérie responsable de l'infection ;
- Et qui diffuse dans l'organe où les bactéries responsables de l'infection sont présentes.

La réalisation d'un prélèvement chez le patient (ex. : hémoculture périphérique, examen cyto bactériologique des urines, etc.) va permettre d'identifier la bactérie et de connaître les antibiotiques actifs et non actifs sur la bactérie isolée (antibiogramme). Ce prélèvement doit être fait avant que le traitement antibiotique ne soit débuter.

Le choix de l'antibiotique doit donc tenir compte : des signes cliniques, de la bactérie suspectée ou identifiée, des résultats de l'antibiogramme, des antécédents du patient, etc.

Il faut distinguer deux notions :

- **Le traitement antibiotique empirique** : c'est le traitement donné en 1^{re} intention avant que la bactérie ne soit isolée et que les résultats de l'antibiogramme ne soient obtenus. Les antibiotiques utilisés en 1^{re} intention ont souvent **un large spectre d'activité** ;

• **Le traitement antibiotique après examen bactériologique** : le choix de l'antibiotique tient compte des résultats (identification bactérienne et antibiogramme) ; **le spectre est ciblé.**

Il peut être nécessaire d'associer deux antibiotiques dans le but d'avoir un effet synergique, de réduire la durée totale de traitement par antibiotique, de réduire le risque de développement de bactérie résistante ⁽⁴⁾.

II.5 Choix de la voie d'administration :

Ce choix dépend :

- De la **notion d'urgence** : dans ce cas la voie injectable (IV) est privilégiée ;
- De la **localisation de l'infection** ;
- Des **formes galéniques disponibles** ;
- De **l'état du tractus digestif du patient** : si nausée et/ou vomissement, la voie orale est inadaptée ;
- Des **interactions médicamenteuses** possibles : un patient traité par anti-vitamines K (AVK) ne doit pas recevoir d'injection intramusculaire (IM) ⁽⁴⁾.

II.6 Familles d'antibiotiques utilisés en thérapeutique :

- ✓ Les bêta-lactamines
- ✓ Les aminosides
- ✓ Les macrolides
- ✓ Les fluoroquinolones
- ✓ Les cyclines
- ✓ Les glycopeptides

Bêtalactamines :

Pénicillines

Ces antibiotiques sont bactéricides. Ils diffusent bien dans tout l'organisme à l'exception du liquide cébrospinal (LCS), sauf en cas de méningite. Ils sont éliminés essentiellement par voie urinaire et sous forme inchangée (non métabolisée) ce qui explique que, chez les patients insuffisants rénaux, la posologie doit être adaptée. Ils sont indiqués dans de nombreuses infections, sévères ou non, en raison de leur large spectre d'activité. Ils s'administrent par voie injectable ou orale ⁽³⁾.

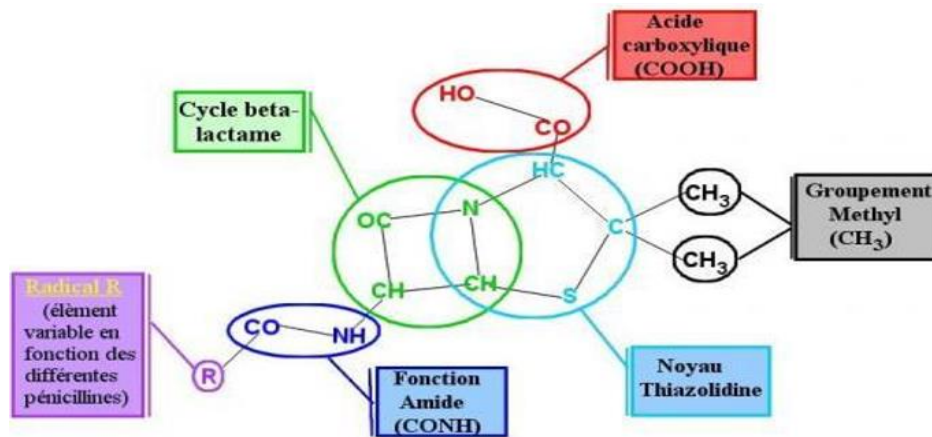


Figure 4 : Formule chimique de la pénicilline

***Pénicilline naturelle = amide de l'acide 6-aminopénicillanique**

Effets indésirables :

- Réactions allergiques : urticaire, éruptions, œdème de Quincke, choc anaphylactique.
- Troubles digestifs : diarrhée, nausées, vomissements, candidoses digestives.
- Troubles hématologiques (anémie, leucopénie, thrombocytopénie)
 - Spectre d'action relativement réduit
 - Problème de résistance des bactéries

Tableau 1 : Principaux antibiotiques de la classe des pénicillines.

Groupe	DCI	Nom commercial
Pénicilline G	Benzylpénicilline	Pénicilline
Pénicilline V	Phénoxyéthylpénicilline	Oracilline
	Benzathine-benzylpénicilline	Extencilline
Pénicilline M	Oxacilline	Bristopen
	Cloxacilline	Orbenine
Pénicilline A	Amoxicilline	Clamoxyl
	Amoxicilline + acide clavulanique	Augmentin
Carboxypénicilline	Ticarclline	Ticarpen
Uréidopénicilline	Pipéracilline + tazobactam	Tazocilline

Les pénicillines semi synthétiques :

On trouve :

- Aminopénicillines
- Carboxypénicillines
- Uréidopénicillines

Aminopénicillines :

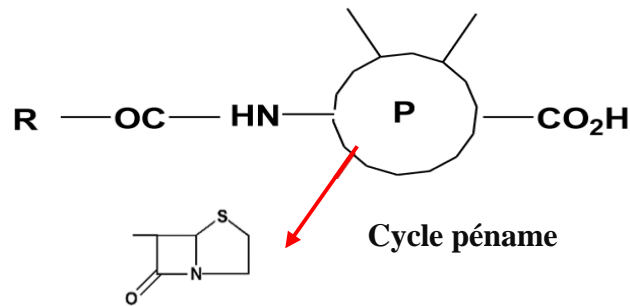


Figure 5 : Formule chimique de l'aminopénicilline

Prototype des aminopénicillines : Ampicilline

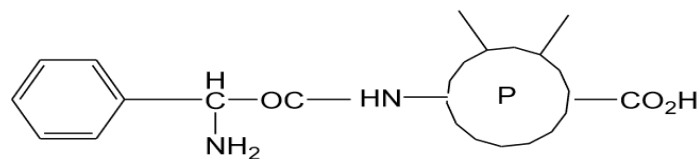


Figure 6 : Formule chimique de l'ampicilline

Spectre d'activité de l'ampicilline :

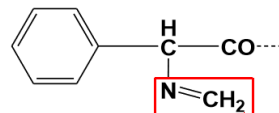
- Active sur toutes les bactéries sensibles à la pénicilline G
- Pas d'activité sur les staphylocoques résistants à la pénicilline G
- Plus active que la pénicilline G sur :
 - Enterococcie
 - Listeria monocytogenèse
 - certaines Borrelia (Borrelia burgdoferi) responsable de la maladie de Lyme)

Autres aminopénicillines :

Les proampicillines

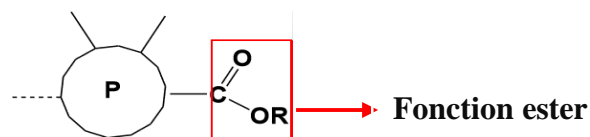
Des promédicaments dont il existe deux variétés :

- résultant de la condensation du groupement amino avec le formol :



Forme imine

- résultant de l'estérification de la fonction acide de l'ampicilline :



Analogues de l'ampicilline :

Le plus utilisé est : **Amoxicilline**

Commercialisée sous les noms : **Aximycine®**

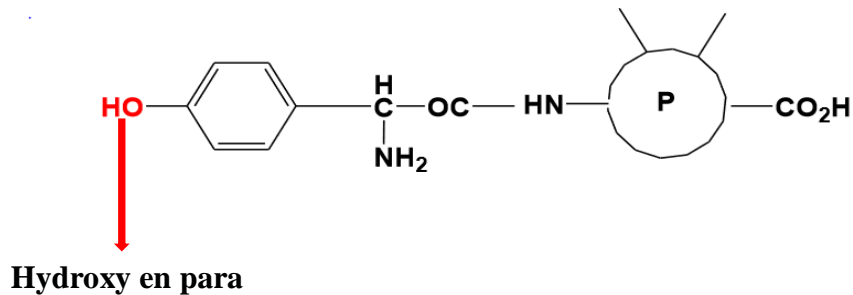


Figure 7 : Formule chimique de l'amoxicilline

Modes d'action :

➤ En **ORL** pour traiter :

- Otites
- Sinusites
- Angines
- Les infections saisonnières justifiant une AB-thérapie (rhinites, rhinopharyngites, laryngites, trachéites)

➤ En **pneumologie** pour traiter :

- Bronchites aiguës
- Pneumopathies communautaires (surviennent en milieu non hospitalier)

➤ En **urologie** pour traiter : infections urinaires basses

➤ En **gastroentérologie** pour traiter : infections digestives

Préférentiellement prescrit pour traiter :

- Fièvre de Malte
- Typhoïde
- Maladie de Lyme
- Ulcères gastroduodénaux par la présence d'un bacille (*Helicobacter pitori*)

Modalités d'utilisation :

- Administrées par voie orale et/ou parentérale
- Les esters de l'ampicilline par voie orale uniquement.

Effets gênants :

Réactions allergiques tardives (presque jamais immédiates)

- Favorisées par la prise simultanée d'un antigoutteux
- Plus fréquentes chez les infectés par l'herpès

Contre-indiquées en cas d'infection virale ⁽³⁾.

III. Axymicine :

L'association la plus typique chez les antibiotiques ;

L'association amoxicilline-acide clavulanique (A-Ac) est largement utilisée en médecine humaine avec près de 3 millions de prescriptions annuelles (selon l'étude permanente de la prescription médicale [EPPM] de la société IMS-Health). L'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques a fait revoir l'ensemble des indications et des modalités d'utilisation des antibiotiques communément admises afin de limiter les prescriptions aux situations où leur bénéfice est prouvé. L'A-Ac est une association fréquemment utilisée en urologie pour traiter les infections postopératoires, les infections d'organe mais aussi en antibioprophylaxie chirurgicale. Cette association est-elle réellement efficace, quelles sont ses failles, quel est le niveau de preuve de son utilisation ? Nous allons tenter de répondre à ces questions ⁽⁵⁾.

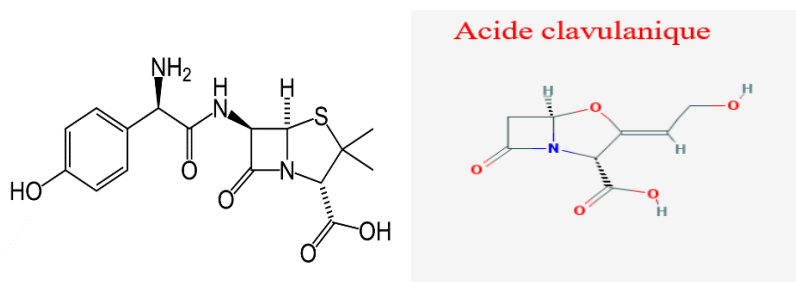


Figure 8 : Amoxicilline et acide Clavulanique

Définitions :

L'amoxicilline est une pénicilline semi-synthétique (**antibiotique** de la classe des bêtalactamines) très largement utilisé. Il inhibe une ou plusieurs enzymes (souvent désignées par protéines liant la pénicilline ou PLP) de la voie de biosynthèse des peptidoglycanes bactériens, composants structurels de la paroi cellulaire bactérienne. L'inhibition de la synthèse des peptidoglycanes conduit à un affaiblissement de la paroi cellulaire, souvent suivi par la lyse et la mort cellulaires. Afin d'améliorer ses performances antibactériennes, il est associé à l'acide clavulanique.

L'acide clavulanique est une bêtalactamine structurellement liée aux pénicillines. Un puissant inhibiteur de bêtalactamases qui inhibe rapidement et irréversiblement la plupart des bêtalactamases produites par des bactéries à Gram + et à Gram-. Il évite ainsi l'inactivation de l'amoxicilline. L'acide clavulanique n'a pas, à lui seul, un effet antibactérien cliniquement pertinent.

De ce fait, l'association d'amoxicilline et d'acide clavulanique se montre active sur un nombre important de bactéries y compris les bactéries résistantes par sécrétion de bêtalactamases de type essentiellement pénicillinases, que cette résistance soit acquise (staphylocoque doré, gonocoque, Haemophilus influenzae, colibacille, Proteus mirabilis) ou naturelle (Klebsiella, Proteus vulgaris, Actinobacillus fragilis).

Dans les spécialités (poudre pour solution injectable), l'amoxicilline est sous forme d'amoxicilline sodique et l'acide clavulanique sous forme de clavulanate de potassium ⁽⁵⁾.

Indications :

Les principales indications sont les infections : respiratoires basses, ORL, gynécologiques, digestives et intra-abdominales, en particulier péritonites, rénales et urogénitales, septicémiques, endocardiques, cutanées et des tissus mous, ostéoarticulaires, à l'exclusion des méningites. Les formes dosées à 1 g/200 mg et à 2 g/ 200 mg sont indiquées chez l'adulte en prophylaxie des infections post-opératoires : des gastrostomies endoscopiques percutanées, des cholécystectomies, en chirurgie digestive sous-mésocolique, en chirurgie carcinologique ORL avec ouverture du tractus oropharyngé ⁽⁵⁾.

Mode d'action :

- **L'amoxicilline a un effet antibiotique.**

Son mode d'action repose sur **l'inhibition de la synthèse de la paroi des germes en multiplication.**

Après la pénétration à travers la membrane bactérienne et la traversée de l'espace périplasmique, l'amoxicilline se lie aux cibles spécifiques situées sur la membrane cytoplasmique : **les PLP ou protéines de liaison à la pénicilline.**

Rappelons que **les PLP jouent un rôle important dans l'édification de la paroi bactérienne en permettant l'assemblage des peptidoglycanes membranaires.**

La fixation covalente de l'amoxicilline sur certaines PLP perturbe leurs actions enzymatiques transpeptidasiques et carboxypeptidasiques. Il en résulte une **inhibition de la formation de la paroi bactérienne** responsable d'un effet bactériostatique de l'amoxicilline.

Par ailleurs, **les bêtalactamines possèdent un effet bactéricide en levant l'inhibition de divers systèmes autolytiques** qui hydrolysent le peptidoglycane, ce qui aboutit à une désorganisation du peptidoglycane et à un **effet léthal.**

- **L'acide clavulanique est un inhibiteur des bêtalactamases.**

Il se comporte, vis-à-vis des bêtalactamases, comme un substrat suicide : il s'agit d'une **inhibition irréversible.** A faible concentration, l'inhibition est puissante sur de nombreuses bêtalactamases de diverses bactéries. Cette aptitude à inhiber les bêtalactamases au sein même de l'espace périplasmique où elles se localisent chez les germes à Gram -, permet à l'amoxicilline associée d'atteindre sans ennui les PLP.

Effets indésirables :

- Troubles digestifs

Ils consistent essentiellement en des **nausées**, des **vomissements**, des **diarrhées**, des **selles molles**, une possibilité de **surinfection digestive à candida**, une **dyspepsie** et des **douleurs abdominales.**

- Manifestations allergiques

Elles se traduisent par de **l'urticaire**, une éosinophilie, une gêne respiratoire, une maladie sérique, une vascularite et exceptionnellement un choc anaphylactique.

Des réactions immunoallergiques, dont des réactions d'hypersensibilité (anaphylaxie) sévères et parfois fatales ont été exceptionnellement observées chez les malades traités par les bêtalactamines ⁽⁵⁾.

Avantages de cette association :

- ✓ Grande analogie avec le noyau pénème
- ✓ Dépourvu d'activité antibactérienne
- ✓ Les β -lactamases ont plus d'affinité avec l'acide clavulanique que le cycle pénème
- ✓ Le complexe β -lactamases-acide clavulanique **covalent** et **irréversible**.

L'association amoxicilline-acide clavulanique a restauré l'efficacité de l'amoxicilline contre :

- ✓ Bactéries résistantes à Amoxicilline (cas des staphylocoques)
- ✓ Bactéries inconstamment sensibles à Amoxicilline (cas des colibacilles comme *Haemophilus influenzae* et *Proteus mirabilis*) ⁽⁶⁾.

Mode d'administration :

Peut être administrée par :

- ✓ Voie orale
- ✓ Voie parentérale

Spectre :

L'ajout de l'acide clavulanique à l'amoxicilline permet d'élargir le spectre de cet antibiotique. Ainsi en plus de spectre de l'amoxicilline, l'association amoxicilline-acide clavulanique permet de récupérer ou d'élargir l'activité sur certaines souches de bactéries sécrétrices de pénicillinases et rencontrées fréquemment en pathologie infectieuses (exemple : *Escherichia. Coli*).

Etudes cliniques :

Les études cliniques ont démontré l'efficacité de l'A-Ac dans les infections dues à des microorganismes résistants à l'amoxicilline mettant en évidence l'intérêt de l'acide clavulanique et son efficacité clinique dans cette indication.

En effet, dans un travail ayant inclus 22 patients qui avaient présenté des infections urinaires dues à des microorganismes résistants à l'amoxicilline traités par l'A-Ac, le taux de guérison était de 64% (77% quand les patients étaient traités par fortes doses d'acide clavulaniques et 54% en cas de faibles doses). Les effets secondaires digestifs étaient plus fréquents en cas d'utilisation de fortes doses d'acides clavulaniques.

L'A-Ac a aussi été évalué dans une étude incluant 78 jeunes filles ayant présenté une infection urinaire certaine et 6 une infection urinaire probable. Deux des microorganismes responsables étaient résistants à l'amoxicilline et sensible à l'A-Ac.

Le traitement par A-Ac a permis la guérison chez les 34 patientes. Mais au cours du suivi d'une durée de 25 jours, il a été noté 7 rechutes et 2 ré-infections.

Par ailleurs, l'A-Ac est plus efficace vis-à-vis des microorganismes sécréteurs de bêtalactamases suivant : *E. Coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, et *Proteus mirabilis*... ⁽⁶⁾.

IV. Critères de pureté et d'identité :

1- Critères organoleptiques :

Il est bien évident que le premier geste de l'analyse en face d'un médicament, principe actif ou excipient, et de s'assurer de l'authenticité du produit actif qu'il a mission de contrôler.

Les méthodes permettant le contrôle des formes pharmaceutiques sont les suivantes :

- **Diagnoses :** effectués sur les contenus des divers emballages d'un même lot réceptionné. Ces méthodes doivent être simples et d'une rapidité compatible avec un travail en série, première série d'opérations de contrôle permettent de s'assurer le lot reçu n'a pas été l'objet d'une erreur grossière d'étiquetage lors d'une manutention.
- Vérification du libellé exact de toutes les étiquettes et des inscriptions apposées sur les divers emballages.
- L'examen des caractères organoleptiques.
- L'aspect : Limpidité et fluidité des liquides, l'homogénéité des poudres et des produits pâteux, la forme, la dimension des cristaux pour les solides.
- La couleur.
- L'odeur : une odeur anormale permet de déceler une souillure ou une altération dans une huile.
- La saveur.
- Vérification des solubilités : la pharmacopée définit les substances entrées solubles, peu soluble, très peu soluble, pratiquement insoluble.

Ensuite en fonction de la matière première, il faudra choisir une ou plusieurs techniques suivantes, basées sur la détermination d'une constante physique ou d'une propriété chimique.

2- Critères physiques :

- **Le point de fusion :** La température de fusion d'une espèce chimique est une constante sure, dont la détermination pourra permettre à la fois l'identification et la vérification de l'absence des substances étrangères, toute modification de cette valeur permet d'affirmer de non-identité ou un défaut de pureté. Dans ce dernier cas, c'est généralement un abaissement de point de fusion que l'on observera.
- **Le pouvoir rotatoire :** Une substance organique ayant un ou plusieurs centres de symétrie est optiquement active, c'est-à-dire possédant la propriété de faire tourner le plan de polarisation de la lumière vers la gauche (lévogyre) ou vers la droite (dextrogyre).

Ce pouvoir est fonction de la longueur d'onde, longueur du trajet de la lumière dans la solution, concentration et température de cette solution et la nature de la substance.

- **L'indice de réfraction :** L'indice de réfraction d'un milieu par rapport à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle de l'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré.

3- Les critères chimiques :

- **Réactions de coloration :** Pour mettre en évidence une substance, on fait appel à des réactions colorées qui ont l'avantage de pouvoir être appréciées visuellement et ne nécessitent aucun appareillage particulier.

4- Les Critères chromatographiques :

➤ Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants, elle est Basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange.

La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase 18 fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'éluion, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale :

$$RF = \frac{\text{Hauteur de la tâche}}{\text{Hauteur du front}}$$

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques ; même Rf).

➤ Chromatographie en phase gazeuse CPG :

La chromatographie en phase gazeuse est l'une des meilleures méthodes Analytiques dans le domaine scientifique, autant en recherche que dans le Domaine industriel (industrie pharmaceutique, agriculture, environnement, etc).

Cette technique fut découverte en 1952 par James et Martin et a fait des Vertigineux, particulièrement grâce à la découverte des détecteurs ultrasensibles. Le seuil de détection de la chromatographie en phase gazeuse, de l'ordre Des parties par bilions, n'a pas encore été égalé. C'est également le seul type de Chromatographie qui utilise un Gaz comme phase mobile, ce qui nécessite un Appareil spécial, appelé communément le chromatographe à gaz.

Dépendant de la phase stationnaire, il est possible d'exploiter les phénomènes D'adsorption ou de partition en chromatographie en phase gazeuse. Le mélange de composés est introduit à l'aide d'une seringue de façon à ce qu'il entre dans la colonne sous forme vapeur. La phase mobile est un gaz chimiquement inerte appelé gaz vecteur. Celui-ci entraîne avec lui le mélange de composés à travers la colonne qui contient une phase stationnaire. Les composés du mélange traversent la colonne à des vitesses différentes. Lorsqu'ils arrivent à la sortie de la colonne. Ils sont détectés par un détecteur qui transmet un signal électrique à un enregistreur. Les résultats apparaissent sur le chromatogramme sous forme de pics.

➤ Chromatographie en phase liquide HPLC :

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). 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 appelé chromatogramme.

5- Critères spectraux :

➤ Spectre d'absorption dans l'ultraviolet :

Certaines molécules organiques en phase vapeur ou en solution ont la propriété d'absorber les radiations de courte longueur d'onde et pourront être identifiées grâce à cette propriété. La molécule absorbe certaines radiations dont la longueur d'onde sera liée à la structure de la molécule, ce qui permet de l'identifier. Cette absorption est favorisée par la présence des groupements chromophores et autochromes. Chaque molécule organique qui absorbe dans l'ultraviolet est définie par son spectre d'absorption (une ou plusieurs bandes) et chaque bande est caractérisée par la longueur d'onde du maximum d'absorption.

➤ Spectre d'absorption dans l'Infrarouge :

Le spectre IR d'une molécule organique est infiniment complexe que le spectre d'absorption dans l'UV.

Pour permettre une identification, il faudra donc tracer comparativement le spectre du produit à identifier et celui du produit pur (substance de référence).

Toute différence entre les deux spectres orientera soit vers une différence de constitution (fréquence non identique) soit vers la présence d'impureté (bande supplémentaire dans le produit à essayer ou intensité relative de bandes respectées) ⁽³⁾.

Ces impuretés peuvent provenir du P.A ou bien des excipients ;

V. Recherche des impuretés dans des principes actifs (substances apparentés)

Les impuretés présentes dans les nouvelles substances médicamenteuses sont traitées sous deux angles différents :

L'aspect chimique, comprenant la classification et la caractérisation des impuretés, la production de rapports, l'énumération des impuretés dans leurs spécificités et un bref exposé des méthodes d'analyse.

L'aspect de l'innocuité, comprenant des lignes spécifiques pour la qualification des impuretés qui n'étaient pas présentes, ou qui l'étaient, mais en concentrations notablement plus faibles, dans les lots de la nouvelle substance médicamenteuse utilisée dans les études d'innocuité et les essais cliniques ⁽²⁾.

V.1 Classification des impuretés :

Les impuretés peuvent être classées dans les catégories suivantes :

- impuretés organiques (liées au procédé et au médicament)
- impuretés inorganiques
- solvants résiduels

Les impuretés organiques peuvent apparaître durant la fabrication et (ou) l'entreposage de la nouvelle substance médicamenteuse. Elles peuvent être connues ou non, volatiles ou non et elles comprennent :

- les produits de base
- les sous-produits
- les intermédiaires
- les produits de dégradation
- les réactifs, les ligands et les catalyseurs

Les impuretés inorganiques peuvent provenir du procédé de fabrication. Généralement, elles sont connues et identifiées et comprennent :

- les réactifs, les ligands et les catalyseurs
- les métaux lourds et autres métaux résiduels
- les sels inorganiques
- d'autres substances (p. ex. les adjuvants de filtration, le charbon actif)

Les solvants sont des liquides organiques ou inorganiques utilisés comme véhicule dans la préparation de solutions ou de suspensions utilisés dans la synthèse d'une nouvelle substance pharmaceutique. Comme leur toxicité est généralement connue, il est aisé de choisir les méthodes de contrôle appropriées.

V.2 Critères de qualification et contrôle des impuretés :

V.2.1 Impureté organique : (spécifié ou non spécifié)

Les impuretés organiques peuvent être dosées à l'aide de différentes techniques, incluant celles qui comparent le résultat analytique d'une impureté à celui d'un standard de référence approprié, ou au résultat obtenu pour la nouvelle substance médicamenteuse elle-même.

Les standards de référence utilisés dans les analyses destinées au contrôle des impuretés doivent être évalués et caractérisés en fonction de leur utilisation projetée. Il est permis d'utiliser la substance médicamenteuse à titre de standard pour estimer la teneur en impuretés. Même dans les cas où les facteurs de réponse de la substance médicamenteuse et de l'impureté en cause ne sont pas rapprochés, cette méthode peut quand même être acceptable à condition qu'un facteur de correction soit appliqué ou que le taux d'impuretés soit surestimé.

Les critères d'acceptabilité et les méthodes d'analyse utilisées pour estimer la teneur en impuretés connues ou inconnues peuvent être fondées sur des postulats d'analyse (p.ex. une réponse semblable du détecteur) les postulats doivent être exposés dans la présentation.

V.2.2 Impuretés inorganiques :

Les impuretés inorganiques sont généralement décelées et quantifiées par des méthodes de pharmacopée européenne ou d'autres méthodes appropriées. La présence de résidus des catalyseurs dans la substance médicamenteuse devrait être étudiée durant le développement. L'inclusion ou l'exclusion des impuretés inorganiques dans les spécifications devrait être discuté. Les critères d'acceptation devraient être fixés en fonction de normes de pharmacopée ou de données reconnues sur l'innocuité.

V.2.3 Solvants résiduels :

La question du contrôle des résidus de solvants utilisés pour la fabrication de la nouvelle substance doit être traitée et présentée conformément au document d'orientation sur les résidus de solvants.

V.3 Méthodes d'analyses :

Les méthodes d'analyse doivent être validées et permettent la détection et l'analyse quantitative des impuretés. Des facteurs techniques comme la capacité de fabrication et les méthodes de contrôle peuvent faire partie de la justification pour le choix de seuils alternatifs appuyés par l'expérience de fabrication selon le procédé proposé par la fabrication à l'échelle commerciale. L'expression du seuil ne reflète pas nécessairement la précision de méthode d'analyse utilisée dans le contrôle régulier de la qualité. Par conséquent, le recours à des techniques moins sensibles (p. ex. chromatographie en couche mince) est parfois acceptable lorsqu'elles sont justifiées et validées de la manière appropriée. Les différences entre les méthodes d'analyse utilisées au cours du développement du produit et celles proposées pour l'analyse du produit commercial doivent être expliquées. Le seuil de détection de la méthode d'analyse doit être inférieur ou égale au seuil de déclaration.

V.4 Impuretés inclut dans les substances médicamenteuses :

Une liste des impuretés doit être incluse dans les spécifications d'une nouvelle substance médicamenteuse (matière première). Les études de stabilité, les études développement du procédé chimique et les analyses systématiques des lots peuvent servir à prévoir quelles impuretés pourraient se retrouver dans le produit commercial.

Chacune des impuretés répondant à des critères spécifiques d'acceptation et devant être incluse dans les spécifications d'une nouvelle substance médicamenteuse est appelée « impureté spécifiée ». Elle peut être connue ou inconnue.

Il faut expliquer les raisons pour lesquelles les impuretés figurent ou non dans les spécifications et joindre une analyse des profils des impuretés obtenus pour les lots ayant servi aux études sur l'innocuité et aux essais cliniques, ainsi qu'une étude du profil des impuretés du produit fabriqué selon le procédé commercial envisagé. Les impuretés spécifiées caractérisées doivent être mentionnées aussi bien que les impuretés spécifiées non caractérisées dont le taux estimé est supérieur au seuil de caractérisation.

Pour les impuretés particulièrement données d'une forte action ou ayant des effets pharmacologiques imprévus ou toxiques, la limite de détection ou de dosage des méthodes d'analyse doit être appropriée pour les concentrations auxquelles les impuretés doivent être contrôlées. Pour

ce qui est des impuretés non inconnues, le procédé et les postulats utilisés pour établir leur concentration doivent être clairement indiqués.

Pour résumer, les spécifications de la nouvelle substance médicamenteuse doivent comprendre, le cas échéant, les types d'impuretés suivants :

- Impuretés organiques
 - chaque impureté spécifiée connue.
 - chaque impureté spécifiée inconnue.
 - toute impureté non spécifiée, dont le critère d'acceptation est inférieur ou égal au seuil de caractérisation.
 - la teneur totale en impuretés.
- Résidus de solvants
- Impuretés inorganiques.

V.5 Qualification des impuretés :

On appelle qualification le processus d'obtention et d'évaluation des données prouvant l'innocuité biologique d'une impureté donnée ou du profil donné d'une impureté au(x) taux spécifié(s). Il faut justifier l'établissement des critères d'acceptation d'une impureté en incluant sur des données d'innocuité.

La concentration de toute impureté présente dans une nouvelle substance médicamenteuse qui a été correctement évaluée au cours d'études sur l'innocuité ou d'essais cliniques serait considérée comme qualifiée. Un taux d'une impureté qualifiée supérieur à celui que l'on trouve dans une nouvelle substance médicamenteuse peut également se justifier par l'analyse des quantités réelles d'impuretés contenu dans le matériel utilisé au cours d'études d'innocuité antérieures.

Des seuils plus élevés ou plus bas pour la qualification d'impuretés peuvent être justifiés pour des médicaments donnés, selon les données scientifiques et les risques potentiels que présente le médicament, y compris les effets de cette classe de médicaments et l'expérience en clinique.

VI. Recherche des impuretés dans les produits médicamenteux existants :

VI.1 Critères de Déclaration des Produits de Dégradation :

Il faut faire une liste des produits de dégradation observés durant la fabrication et les études de stabilité du produit fini existant. Il faut s'appuyer sur une appréciation scientifique solide des voies possibles de dégradation dans le produit fini existant et des produits de dégradation provenant de l'interaction avec des excipients et/ou le système récipient-fermeture.

De plus, il faut donner un aperçu de toutes les études de laboratoire menées pour détecter les produits de dégradation dans le produit fini existant. Cet aperçu doit comprendre les résultats de tests réalisés sur des lots de développement et sur des lots fabriqués au moyen du procédé de fabrication à l'échelle commerciale proposé. Il faut préciser les critères de l'exclusion d'impuretés qui ne sont pas des produits de dégradation.

Il n'est généralement pas nécessaire de caractériser les produits de dégradation présents à des concentrations inférieures ou égales aux seuils de caractérisation. Toutefois, il faut élaborer des méthodes d'analyse pour ceux qui sont soupçonnés d'être exceptionnellement actifs ou susceptibles de produire des effets toxiques ou pharmacologiques importants à des concentrations inférieures ou égales aux seuils de caractérisation. Dans certains cas exceptionnels, des facteurs peuvent justifier

en partie l'utilisation de seuils différents en fonction de l'expérience de fabrication au moyen du procédé de fabrication à l'échelle commerciale proposé.

VI.2 Méthodes d'analyses :

Les présentations doivent inclure des données prouvant que les méthodes d'analyse ont été validées et conviennent à la détection des produits de dégradation. Les méthodes d'analyse doivent, plus précisément, être validées par des données prouvant la spécificité des produits de dégradation spécifiés et non spécifiés. Lorsque les méthodes d'analyse révèlent la présence de pics autres que ceux des produits de dégradation (p. ex., de substance médicamenteuse, d'impuretés provenant de la synthèse de la substance médicamenteuse, d'excipients et d'impuretés provenant d'excipients), ces pics doivent être indiqués aux chromatogrammes, et leur origine doit faire l'objet d'une explication dans les documents de validation.

On peut analyser les produits de dégradation à l'aide de différentes techniques, dont celles qui permettent de comparer les résultats d'analyse d'un produit de dégradation à un étalon de référence approprié ou aux résultats obtenus pour la substance médicamenteuse existante elle-même. Les critères d'acceptation et les méthodes d'analyse utilisés pour déterminer la teneur en produits de dégradation connus ou non sont souvent fondés sur des postulats d'analyse (p. ex., une réponse semblable du détecteur) qui doivent être exposés dans les présentations.

VI.3 Déclaration du Contenu de Produits de Dégradation des Lots :

Les présentations doivent faire état des résultats d'analyse pour tous les lots appropriés de produits utilisés dans les essais cliniques et les essais d'innocuité et de stabilité ainsi que pour des lots représentatifs du procédé de fabrication à l'échelle commerciale proposé. Il convient de présenter les données quantitatives sous forme numérique plutôt que dans des termes généraux comme « est conforme à » et « n'excède pas le seuil ». Tout produit de dégradation présent en quantité supérieure au seuil de déclaration et la quantité totale de produits de dégradation observés dans les lots appropriés des produits existants doivent être déclarés, et les méthodes d'analyse utilisées qui ont permis leur détection doivent être indiquées.

Les produits de dégradation doivent être désignés par un code ou une description appropriée comme « temps de rétention ». Les présentations qui proposent un seuil de déclaration plus élevé doivent offrir une justification complète d'une telle proposition. Tous les produits de dégradation qui excèdent le seuil de déclaration doivent être additionnés et présentés sous forme de total.

Les renseignements suivants doivent être fournis pour chaque lot de produit existant décrit dans la présentation :

- Le numéro, la teneur et la taille du lot
- La date de fabrication
- Le lieu de fabrication
- Le procédé de fabrication
- Le système récipient-fermeture
- La teneur individuelle de chacun et la teneur totale des produits de dégradation
- L'utilisation du lot
- La référence aux méthodes d'analyse utilisées
- Le numéro de lot de la substance médicamenteuse utilisée dans le produit fini existant
- Les conditions d'entreposage en vigueur pour les études de stabilité

VI.4 Énumération des Produits de Dégradation dans les Spécifications :

Les spécifications d'un produit existant doivent comprendre la liste des produits de dégradation susceptibles d'être générés durant la fabrication du produit fini ainsi que lorsqu'il est entreposé dans les conditions recommandées. Le profil de dégradation doit être établi à partir des études de stabilité, des voies de dégradation, des études de développement du produit et des études de laboratoire.

Le critère d'acceptation de tout produit de dégradation doit être établi en tenant compte de son critère d'acceptation dans la substance médicamenteuse (s'il y a lieu), de sa concentration qualifiée, de l'augmentation de celle-ci au cours des études de stabilité et de la durée et des conditions de conservation proposées pour le produit existant. De plus, aucun critère d'acceptation ne doit excéder la concentration qualifiée de chaque produit de dégradation.

En résumé, les spécifications de produits existants doivent inclure, s'il y a lieu, les produits de dégradation suivants :

- Chaque produit de dégradation spécifié identifiée
- Chaque produit de dégradation spécifié non identifiée
- Tout produit de dégradation non spécifié pour lequel on a déterminé un critère d'acceptation inférieur ou égal au seuil de caractérisation
- Le total des produits de dégradation

VI.5 Qualification des Produits de Dégradation :

On appelle qualification le processus de collecte et d'évaluation des données établissant l'innocuité biologique d'un produit de dégradation donné ou du profil de dégradation donné au(x) concentration(s) spécifiée(s). Il faut justifier l'établissement du critère d'acceptation du produit de dégradation en se fondant sur des données d'innocuité. La concentration de tout produit de dégradation présent dans un produit existant qui a été correctement mis à l'épreuve au cours d'études sur l'innocuité ou d'essais cliniques est considérée comme qualifiée.

Des concentrations de produits de dégradation supérieures à celles administrées dans le cadre d'études sur l'innocuité peuvent être considérées comme qualifiées selon les résultats de la comparaison des doses réellement administrées durant les études sur l'innocuité et les doses visées pour le produit existant. La justification de ces concentrations supérieures doit tenir compte des facteurs suivants :

- La quantité de produit de dégradation administrée dans des études sur l'innocuité ou des essais cliniques antérieurs qui se sont révélée sans danger.
- L'augmentation de la quantité de produit de dégradation
- Selon le cas, d'autres facteurs liés à l'innocuité.

Les études sur l'innocuité doivent comparer les résultats des épreuves d'innocuité du produit existante ou de la substance médicamenteuse contenant une concentration représentative du produit de dégradation à ceux de produits ou de substances déjà qualifiés, bien que des études sur des produits de dégradation isolés puissent parfois être jugées acceptables.

VI.6 Substance chimique de référence :

La substance chimique de référence est définie comme un matériau prévu pour être utiliser dans des essais chimiques et physiques spécifiques, dans lesquels ces propriétés sont comparées aux propriétés des échantillons à examiner. Le degré de pureté d'une telle substance dépend du but de son utilisation ⁽²⁾.

I-Objectif :

La Pharmacopée européenne contient une série de monographies générales sur la fabrication des médicaments, des méthodes générales d'analyse de substances et de médicaments, et certaines exigences générales sur les formes de dosage (comprimés, gélules, injections, etc.). Les méthodes d'analyse peuvent aussi être utilisées par l'industrie pharmaceutique pour les substances et les médicaments non décrits dans la pharmacopée.

La majeure partie de la Ph. Eur est composée des normes de qualité, qui figurent dans les monographies et dans les sections sur les méthodes générales. Les normes de qualité contiennent des méthodes analytiques pour identifier la substance et évaluer sa qualité et sa force quantitative. La partie la plus importante d'une norme de qualité d'un principe actif est peut-être bien la section sur les impuretés.

Les principes actifs des médicaments sont pharmacologiquement actifs en raison de la structure de la molécule chimique. Aucune substance ne peut être pure à 100 %, et les impuretés peuvent provenir :

- Du mode de fabrication (mode de production ou de synthétisation d'une substance) ;
- De la dégradation de la substance active (en d'autres mots, si elle se décompose).

Ces impuretés peuvent avoir une structure chimique plus ou moins semblable à celle du principe actif lui-même. Elles peuvent aussi être pharmacologiquement actives (d'une manière similaire à celle du principe actif ou différemment). Les impuretés peuvent avoir un effet non souhaité. Elles peuvent par exemple être toxiques.

Ainsi, pour exemple, le paracétamol peut se dégrader facilement en 4-aminophénol. Or, selon la fiche de données de sécurité de celui-ci, disponible auprès des fournisseurs de matière première, le 4-aminophénol peut être très dangereux en cas de contact avec la peau, d'ingestion ou d'inhalation. Même si aucune précision sur les risques d'effets carcinogènes, tératogènes ou mutagènes n'est apportée par la fiche de sécurité, il est impératif de vérifier la non dégradation du paracétamol. D'autant plus que le 4-aminophénol possède également des propriétés néphrotoxiques.

Après une constatation du changement de couleur des comprimés contenant l'amoxicilline et l'acide clavulanique, on a effectué des études de ce produit par dosage des P.A et recherche des impuretés par la méthode de chromatographie liquide HPLC.

II. Instrumentation :

II-1 Chromatographie liquide à haute performance HPLC :



Figure 9 : HPLC WATERS ALLIANCE e2695

➤ Appareillage :

L'appareillage se compose d'un système de pompe, d'un injecteur, d'une colonne Chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur). La phase mobile, délivrée à partir d'un ou plusieurs réservoirs, circule à travers la colonne, généralement à débit constant, puis passe à travers le détecteur.

➤ Système de pompe :

Les systèmes de pompage pour CL doivent fournir la phase mobile à un débit constant. Il convient de limiter autant que possible les fluctuations de la pression. Les pompes pour CL peuvent être équipées d'un dispositif de purge qui permet de chasser les bulles d'air emprisonnées.

➤ Injecteur :

La solution à examiner est introduite dans la phase mobile circulant en tête de colonne, ou à proximité de celle-ci, à l'aide d'un système d'injection conçu pour fonctionner à pression élevée.

➤ Colonne :

Une colonne spécifique pour le produit à analyser, en inox, de quelques centimètres de longueur et remplie d'une phase stationnaire généralement en silice.

➤ Détecteur :

Les détecteurs les plus utilisés sont les spectrophotomètres à barrette de diode (détecteur UV/Vis). La détection peut également reposer sur la fluorimétrie, la réfractométrie différentielle, des méthodes électrochimiques, la spectrométrie de masse, la dispersion de la lumière, la radioactivité et d'autres méthodes particulières.

II.2 Spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge (IR) :



Figure 10 : PERKIN ELMER SPECTRUM 100.

La spectroscopie IR est une méthode de caractérisation rapide et sensible de la plupart des molécules existantes.

La spectroscopie infrarouge est la mesure de la diminution de l'intensité du rayonnement qui traverse un échantillon en fonction de la longueur d'onde. Le rayonnement infrarouge dispense suffisamment d'énergie pour stimuler les vibrations moléculaires à des niveaux d'énergie supérieurs. La spectroscopie infrarouge s'utilise principalement pour l'analyse qualitative d'une molécule en mettant en évidence la présence des liaisons entre les atomes (fonctions et groupements).

II.3 Titrateur Karl Fischer :



Figure 11 : Appareil Titrateur volumétrique Karl Fischer METTLER TOLEDO DL 38.

La détermination de la teneur en eau constitue une des principales analyses effectuées pour de nombreuses matières premières et produits finis. Les titrateurs volumétriques Karl Fischer, de par leur conception et leur algorithme de titrage, permettent d'obtenir, rapidement, un résultat fiable ainsi que des indications claires sur la qualité de l'échantillon.

Le titrage par la méthode Karl Fischer possède les avantages suivants :

- Spécificité et précision élevées. - Gamme très large de concentrations analysables, allant de 100 ppm à 100% d'eau.
- Durée de détermination courte. Ce titrage utilise le principe de l'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode en présence d'eau.

La réaction peut être écrite comme suit :



II.4 Appareil de désagrégation :

Un instrument destiné à évaluer le temps de décomposition du médicament dans le corps humain (estomac ou intestin) est l'appareil de désagrégation, ce dernier est présenté comme suit :



Figure 12 : Appareil de désagrégation.

Le milieu dans lequel le temps de décomposition des comprimés est évalué, est choisi selon la nature de ces derniers ; on utilise souvent l'eau distillée comme solution pour les comprimés sans enrobage et une solution acide pour les comprimés enrobés. L'appareil de désagrégation comprend les éléments suivants :

- **Un dispositif de plongeon** : permettant de plonger et remonter l'ensemble support panier verticalement le long de son axe à l'intérieur du liquide d'immersion à un rythme constant.
- **Un ensemble support-panier** : composé de six tubes en verre ouverts aux deux extrémités, chacun ayant une longueur de $7,75 \pm 0,25$ cm, les tubes sont maintenus en position verticale par deux plaques de plastique superposées d'environ 9 cm de diamètre.
- **Six disques** : cylindriques à rainure et perforés. Chaque disque est fait de matière plastique transparente.
- **Un bocal** : cylindrique en verre ayant un diamètre extérieur d'environ 15 cm et une hauteur de 20 à 21 cm.
- **Un bain-marie** : ou tout autre dispositif permettant de tenir le liquide d'essai dans le bocal à une température de $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

III- Méthodes et discussions :

A- CONTROLE DE QUALITE DE LA MATIERE PREMIERE

I. Principe actif : AMOXICILLINE trihydratée. ($\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}, 3\text{H}_2\text{O}$)

Définition :

Acide (2S, 5R, 6R) -6-[[[(2R) -2-amino-2-4-hydroxylphényl) -acétyl] amino] -3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0] -heptane-2-carboxylique trihydraté.

Produit hémisynthétique dérivé d'un produit de fermentation.

Le contrôle de qualité de l'amoxicilline trihydratée a été effectué sur 100 lots répartis en quatre composites homogènes.

I.1 Contrôle organoleptique :

Aspect

Poudre cristalline de couleur blanchâtre ou sensiblement blanche, de saveur sucrée.

Solubilité

Peu soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'éthanol à 96%, pratiquement insoluble dans les huiles grasses. L'amoxicilline trihydratée se dissout dans les acides dilués et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

I.2 Identification :

L'identification de l'amoxicilline trihydratée se fait spectrophotométrie dans l'infrarouge IR en le comparant avec l'amoxicilline trihydratée SCR.

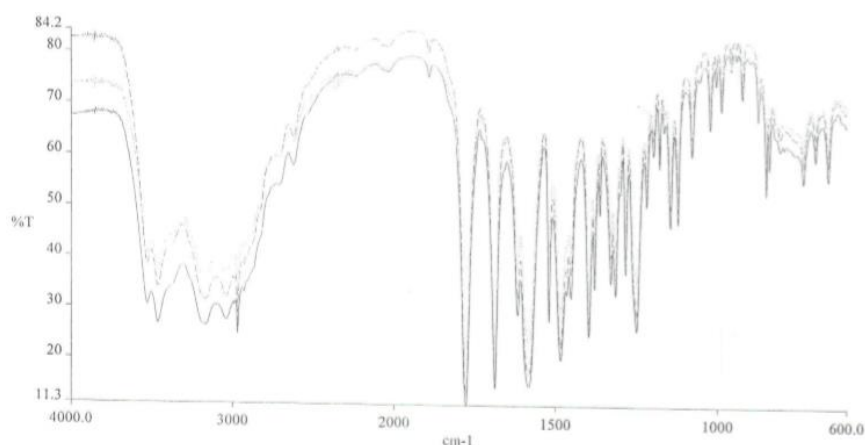


Figure 13 : Spectre IR de l'amoxicilline trihydratée.

On remarque que les deux spectres de l'amoxicilline trihydratée pure et l'amoxicilline trihydratée SCR sont superposables, alors le résultat est positif.

Le spectre montre en particulier ;

- ❖ La présence d'une vibration d'élongation $\nu\text{C}=\text{O}$ du groupe bêtalactame vers **1775 cm^{-1}** .
- ❖ La présence d'une vibration d'élongation $\nu\text{C}=\text{O}$ de la fonction acide vers **1732 cm^{-1}** .
- ❖ La fonction amide du cycle bêtalactame se présente sous forme d'une vibration d'élongation $\nu\text{C}=\text{O}$ vers **1686 cm^{-1}** .
- ❖ La présence d'une bande $\nu\text{O}-\text{H}$ large de la fonction acide vers **3350-2560 cm^{-1}** .
- ❖ La bande $\nu\text{O}-\text{H}$ large qui caractérise la fonction alcool (groupe phénol) vers **3300-3600 cm^{-1}** .

I.3 Détermination du pH et dosage de la teneur en eau :

Préparation de la solution S :

Dissolvez, à l'aide d'ultrasons ou en chauffant légèrement 0.100 g d'amoxicilline trihydratée dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R et complétez à 50.0 ml avec le même solvant.

★ **pH** : Normes 3.5 à 5.5

Le pH de la solution S est déterminé par le pH-mètre WTW inolab ;

pH= 4,563

★ **Teneur en eau** : Normes 11.5% à 14.5%

Déterminé sur 0.100 g d'amoxicilline trihydratée en utilisant un Titrateur volumétrique Karl Fischer.

Te= 12,56%

I.4 Substances apparentées et dosage de l'amoxicilline trihydratée :

En se basant sur la pharmacopée européenne, et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

❖ Protocole d'analyse :

Conditions chromatographiques :

- Colonne** : lichrospher octadécylsilylé pour chromatographie 5 μ m, l= 0,25 m, \varnothing = 4,6 mm
- Détection** : spectrophotomètre à 254 nm
- Débit** : 1,0 ml/min
- Volume injecté** : 50 μ l
- Phase mobile** :
 - A : 1V Acétonitrile et 99V de solution tampon (pH5,0).
 - B : 20V Acétonitrile et 80V de solution tampon (pH5,0).

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent V/V)	Phase mobile B (pour cent V/V)
0-t _R	92	8
t _R -(t _R +25)	92 \longrightarrow 0	8 \longrightarrow 100
(t _R +25) - (t _R +40)	0	100
(t _R +40) - (t _R +55)	92	8
t _R = temps de rétention de l'amoxicilline déterminé avec la solution témoin (c)		

❖ Préparation des solutions :

➤ Solution tampon pH 5.0

On prélève 250 ml de solution de phosphate monopotassique 0.2 M, on ajuste à pH 5.0 avec la quantité nécessaire de solution diluée d'hydroxyde de sodium, puis on complète à 1000 ml avec de l'eau.

➤ Solution à examiner (a)

On dissout 30.0 mg d'amoxicilline trihydratée dans la phase mobile A et on complète à 50.0 ml avec la phase mobile A.

➤ **Solution à examiner (b)**

On dissout 30.0 mg d'amoxicilline trihydratée dans la phase mobile A et on complète à 20.0 ml avec la phase mobile A.

➤ **Solution témoin (a)**

On dissout 30.0 mg d'amoxicilline trihydratée SCR dans la phase mobile A et on complète à 50.0 ml avec la phase mobile A.

➤ **Solution témoin (b)**

On dissout 4.0 mg de céfadroxil SCR dans la phase mobile A et on complète à 50 ml avec la phase mobile A. A 5.0 ml de cette solution, on ajoute 5.0 ml de solution témoin (a) puis on complète à 100 ml avec la phase mobile A.

➤ **Solution témoin (c)**

On prélève 2.0 ml de solution témoin (a) et on complète à 20.0 ml avec la phase mobile A. On prélève ensuite 5.0 ml de cette solution et on complète à 20.0 ml avec la phase mobile A.

a) Substances apparentées :

★ **Procédé**

On injecte la phase mobile A comme blanc selon le gradient décrit sous phase mobile ;
On injecte 50 µl des solutions témoins (b) et (c) en élution isocratique avec la phase mobile à la composition initiale ;

-La solution témoin (b) pour la conformité du système

-La solution témoin (c) pour le calcul des impuretés

On injecte 50 µl de solution à examiner (b) selon le gradient décrit sous phase mobile ;

★ **Conformité de système :**

Résolution : Au minimum 2.0 entre les pics dus à l'amoxicilline et au céfadroxil

★ **Résultats :**

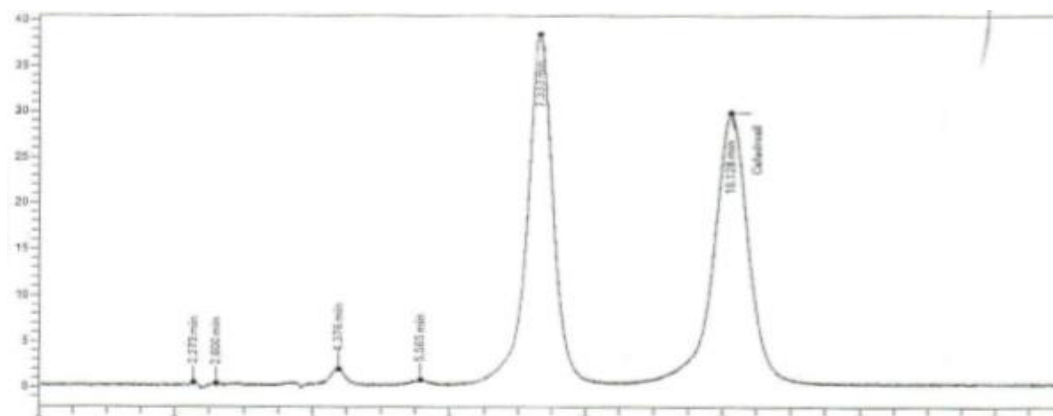


Figure 14 : Chromatogramme de la solution témoin (b) des substances apparentées.

Tableau 2 : Résultats de conformité du système (solution témoin b) des substances apparentées

Component Name	Time	Area	Height	Resolution
	2.27	4,014	565.0	
	2.60	5,874	451.9	0.79
	4.38	42,395	2,017.0	3.43
	5.57	14,420	590.7	2.20
Amoxicilline	7.33	1,051,438	38,242.6	2.70
Cefadroxil	10.13	1,052,860	29,526.8	3.64
Total		2,171,001		

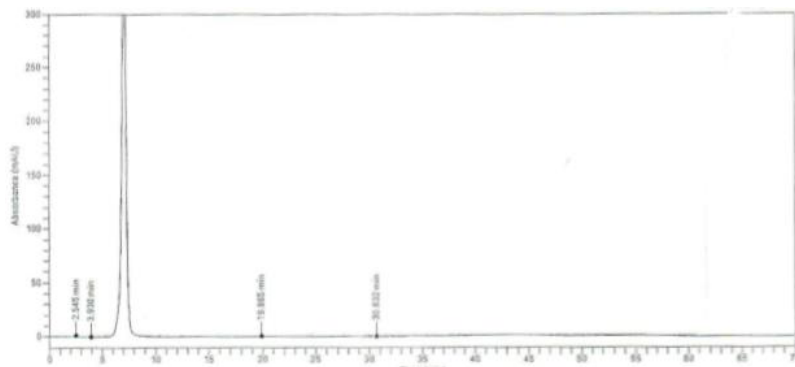


Figure 15 : Figure 10 : Chromatogramme de la solution Essai des substances apparentées.

Tableau 3 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution essai des substances apparentées

Component Name	Time	Area	Height
	2.54	14,957	1,266.0
	3.93	3,475	410.7
Amoxicilline	7.12	11,383,589	421,015.5
	19.86	21,346	823.8
	30.63	11,254	544.7
Total		11,434,621	

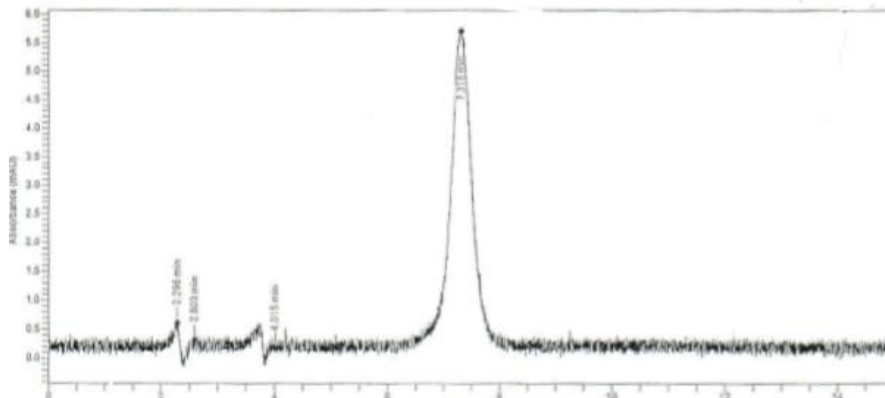


Figure 16 : Chromatogramme de la solution témoin (c) des substances apparentées.

Tableau 4 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution témoin (c) des substances apparentées

Component Name	Time	Area	Height	Resolution
	2.30	4,780	583.2	
	2.60	2,552	240.1	0.56
	4.02	3,973	252.2	1.62
Amoxicilline	7.32	142,260	5,476.0	4.10
Total		153,565		

-toute impureté : pour chaque impureté, au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) ne dépasse pas 1.0 pour cent.

Surface du témoin (c) → 1%

Surface de la plus grande impureté → **X**

142260 → 1%

21346 → **X**

$$X = 0,15\%$$

Le calcul des composants non reconnus est inférieure à 1%

Signal bruit :

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

$$S/N = 2 \times \frac{4}{0.6}$$

$$S/N = 13,3$$

b) Dosage :

★ **Procédé**

- Injecter le blanc
- Injecter la solution témoin (a) Pour la conformité du système
- Injecter la solution à examiner (a)

★ **Conformité de système :**

Répétabilité : écart type relatif au maximum 1.0 pour cent après 6 injections.

★ **Résultats :**

Tableau 5 : Résultats des surfaces de la répétabilité du témoin (a) lors du dosage de l'amoxicilline

		Area
1	Témoin a	172827.7
2	Témoin a	175824.6
3	Témoin a	171566.0
4	Témoin a	174081.1
5	Témoin a	174770.6
6	Témoin a	171165.6
	Total	1040234.6

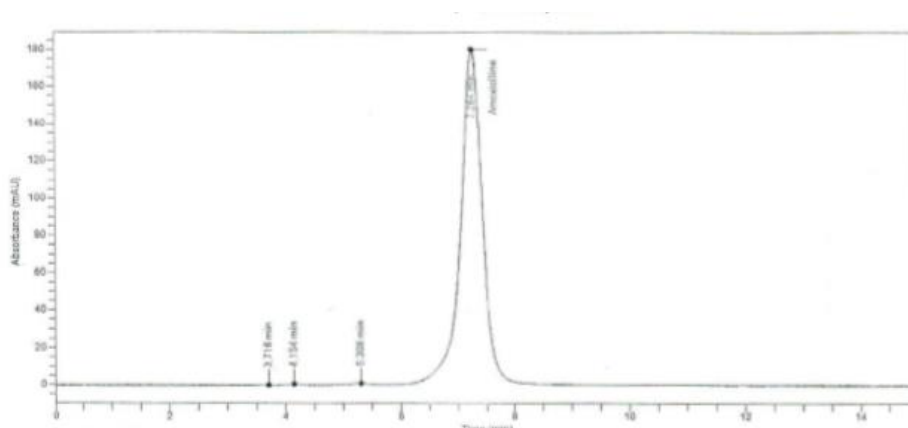


Figure 17 : Chromatogramme de la solution Essai lors du dosage de l'amoxicilline.

Tableau 6 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) lors du dosage de l'amoxicilline

Component Name	Time (min)	Area	Height	Resolution
	3.72	10,683	605.9	
	4.15	28,118	1,100.9	0.82
	5.31	45,468	1,628.1	2.00
Amoxicilline	7.26	4,910,487	180,748.0	3.09
Total		4,994,757		

Calcul de la teneur en amoxicilline trihydratée : Normes : 95.0 % à 102.0 %

Le calcul de la teneur pour cent en $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ se fait en tenant compte de la teneur assignée de l'amoxicilline trihydratée SCR.

Ce calcul se fait selon la formule suivante selon la pharmacopée européenne :

$$T_{\text{amox}} = \frac{S.E}{S.T} \times \frac{P.T}{P.E} \times \frac{100}{100 - T_e} \times \frac{100 \times \text{Titre détalon}}{100}$$

T : teneur en amoxicilline trihydratée

S.E : surface d'essai de l'amoxicilline trihydratée

S.T : surface du témoin d'amoxicilline trihydratée SCR

P.E : prise d'essai de l'amoxicilline dans la solution à examiner (a)

P.T : prise d'essai de l'amoxicilline dans la solution témoin (a)

Te : teneur en eau de l'amoxicilline trihydratée

Titre d'étalon : teneur assignée de l'amoxicilline trihydratée SCR

Application numérique :

$$T_{\text{amox}} = \frac{4910487}{4727425} \times \frac{30.1}{30.9} \times \frac{100}{100-12.56} \times \frac{100 \times 86.33}{100}$$

$$T_{\text{amox}} = 99.9\%$$

On remarque que le résultat de la teneur en amoxicilline obtenu respecte les normes recommandées par la pharmacopée européenne, donc il est conforme.

II. Principe actif : ACIDE CLAVULANIQUE

NB : l'acide clavulanique est utilisé sous forme de clavulanate de potassium.

Définition :

Mélange sec de clavulanate de potassium et de cellulose microcristalline ou de silice colloïdale anhydre ou de silice colloïdale hydratée.

II.1 Contrôle organoleptique :

Aspect :

Poudre blanche, hygroscopique

Solubilité :

Facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 %, très peu soluble dans l'acétone.

II.2 Identification :

Lors du dosage, il faut que le pic principal de la solution à examiner doit être semblable de la solution témoin (a).

C'est ce qu'on va vérifier pendant l'analyse.

II.3 Détermination du pH et dosage de la teneur en eau :

On met en suspension une quantité de clavulanate de potassium dilué correspondant à 0.200g de clavulanate de potassium dans 20 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone.

Le pH de la solution est déterminé par le pH-mètre WTW inolab : Normes 4.8 à 8

$$\text{pH} = 5.366$$

La teneur en eau est mesurée par le titrateur KARL FISHER ; Normes ≤ 2.5

$$Te = 1.53 \%$$

II.4 Substances apparentées et dosage de l'acide clavulanique :

a) Substances apparentées :

En se basant sur la pharmacopée européenne, et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

❖ Protocole d'analyse :

Conditions chromatographiques :

- **Colonne** : lichrospher octadécylsilylé pour chromatographie 5 μ m, l= 0,10 m, \varnothing = 4,6 mm
- **Détection** : spectrophotomètre à 230 nm
- **Débit** : 1,0 ml/min
- **Volume injecté** : 20 μ l
- **Température** : 40°C
- **Phase mobile** :

- A : Acide phosphorique dilué et solution de phosphate monosodique à 7.8 g/L (pH4,0).
- B : mélange de de phase mobile A et de méthanol.

Intervalle (min)	Phase mobile A % V/V	Phase mobile B % V/V
0-4	100	0
4-15	100→50	0→50
15-18	50	50

❖ Préparation des solutions :

➤ Solution à examiner :

On disperse une quantité de clavulanate de potassium dilué correspondant à 0.250 g de clavulanate de potassium dans 5 ml de phase mobile A, on complète à 25.0 ml avec la phase mobile A et on filtre.

➤ Solution témoin (a) :

On prélève 1.0 ml de solution à examiner et on complète à 100.0 ml avec la phase mobile.

➤ Solution témoin (b) :

On dissout 10 mg d'amoxicilline trihydratée SCR dans 1 ml de solution à examiner et on complète à 100 ml avec la phase mobile A.

➤ Solution témoin (c) :

On dissout 2 mg d'impureté G de clavulanate de potassium SCR dans 20 ml de phase mobile A.

*** Procédé**

- Injecter le blanc ;
- Injecter la solution témoin (b) pour la conformité de système ;

- Injecter la solution témoin (a) et (c) pour le calcul des impuretés ;
- Injecter de la solution à analyser ;

★ **Conformité du système**

Résolution : Au minimum 13 entre les pics dus au clavulanate (1^{er} pic) et à l'amoxicilline (2^e pic).

★ **Résultats :**

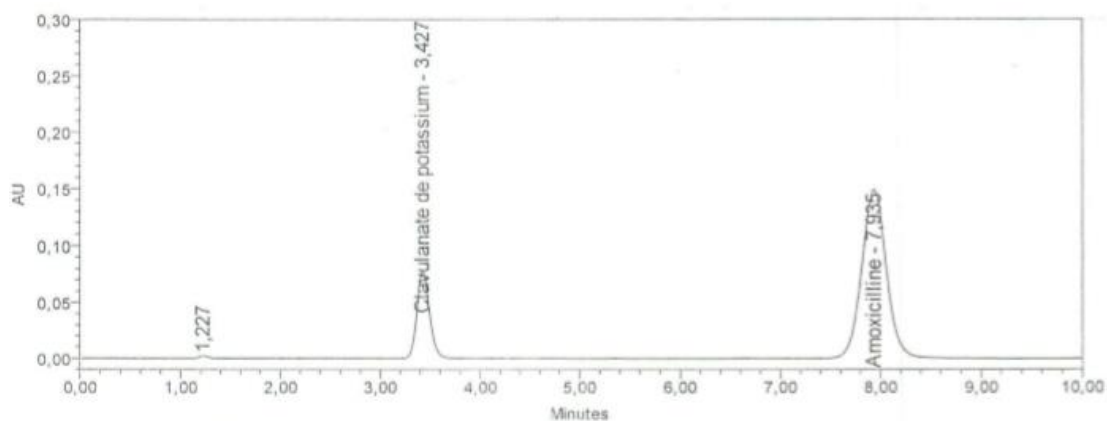


Figure 18 : Chromatogramme de la solution témoin (b) des substances apparentées.

Tableau 7 : Résultats de conformité du système (solution témoin b) des substances apparentées

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Resolution
1	W2489 ChA 230nm		1,227	14644	0,44	
2	W2489 ChA 230nm	Clavulanate de potassium	3,427	706127	21,42	11,12
3	W2489 ChA 230nm	Amoxicilline	7,935	2575416	78,13	13,33

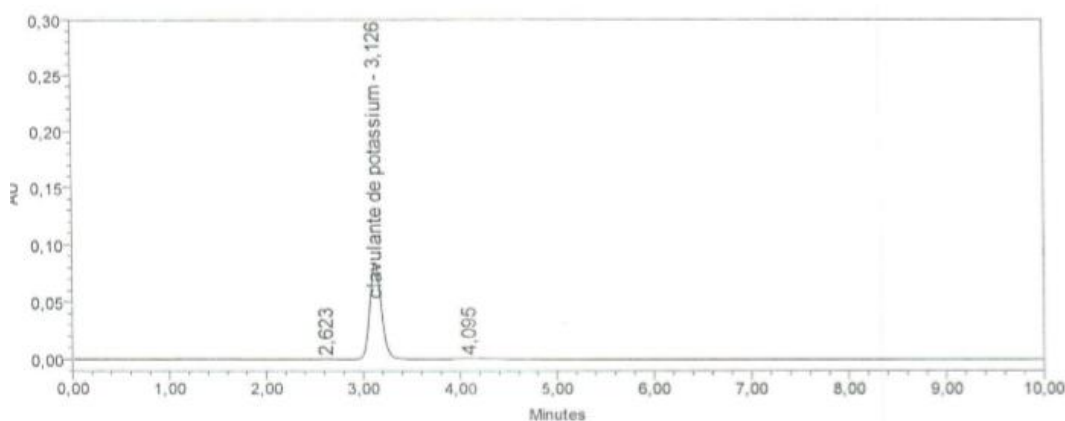


Figure 19 : Chromatogramme de la solution témoin (a) des substances apparentées.

Tableau 8 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution témoin (a) des substances apparentées

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area
1	W2489 ChA 230nm		2,623	2896	0,40
2	W2489 ChA 230nm	clavulante de potassium	3,126	703322	96,93
3	W2489 ChA 230nm		4,095	19403	2,67

Selon la pharmacopée européenne ;

TR du principe actif = environ 3 min

TR de l'impureté E = environ 2.3 min

TR de l'impureté G = environ 3.6 min

La limite d'exclusion :

La limite d'exclusion est la limite en dessous de laquelle on ne tient pas compte des pics pour le calcul ;

0.05 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (ne dépasse pas 0.05 %).

$$\text{Surface du témoin (a)} \times 0.05 \rightarrow 0.05 \%$$

$$703322 \times 0.05 = \mathbf{35166.1}$$

Toutes surfaces des pics qui sont inférieure à cette limite ne sont pas pris en considération pour le calcul des impuretés.

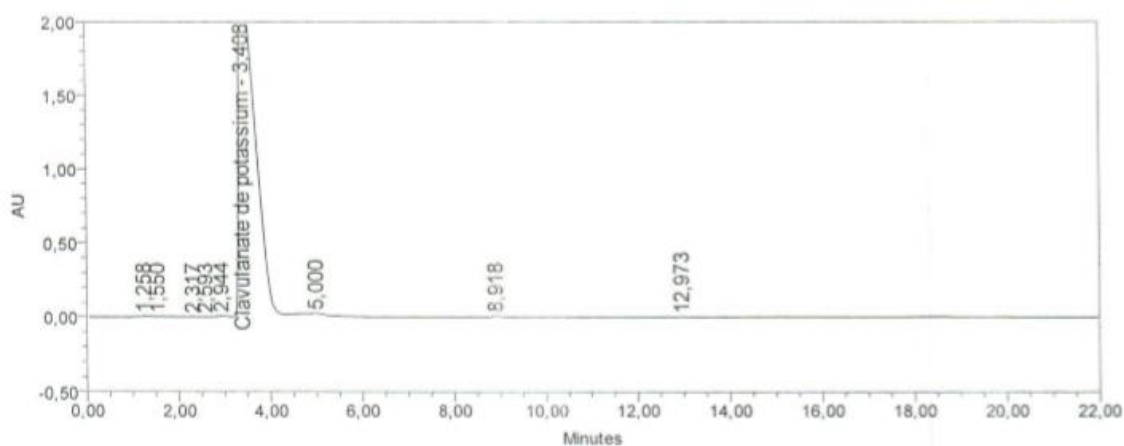


Figure 20 : Chromatogramme de la solution essai des substances apparentées.

Tableau 9 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution essai des substances apparentées

	Processed Channel Descr.	Name	RT	Area	% Area
1	W2489 ChA 230nm		1,258	11487	0,02
2	W2489 ChA 230nm		1,550	1497	0,00
3	W2489 ChA 230nm		2,317	25544	0,04
4	W2489 ChA 230nm		2,593	6568	0,01
5	W2489 ChA 230nm		2,944	92897	0,16
6	W2489 ChA 230nm	Clavulanate de potassium	3,408	56597329	99,57
7	W2489 ChA 230nm		5,000	26339	0,05
8	W2489 ChA 230nm		8,918	55069	0,10

	Processed Channel Descr.	Name	RT	Area	% Area
9	W2489 ChA 230nm		12,973	27666	0,05

Calcul des impuretés :

- Impureté E, G : pour chaque impureté, au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) ne dépasse pas 1 %.

Impureté E :

Surface de la solution témoin (a) → 1 %

Surface de l'imp E dans la solution à examiner → 0 %

TR du P.A + TR de l'imp E = 6.9 min

Dans le chromatogramme de la solution à analyser il n'y a aucun pic dans les alentours de 6.9 min ce qui confirme l'absence de l'impureté E.

Impureté G :

Surface de la solution témoin (a) → 1 %

Surface de l'imp G dans la solution à examiner → 0 %

TR du P.A + TR de l'impureté G = 10.8 min

Dans le chromatogramme de la solution à analyser il n'y a aucun pic dans les alentours de 10.8 min ce qui confirme l'absence de l'impureté G.

- Toute autre impureté : pour chaque impureté, au maximum 0.2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) ne dépasse pas 0.2%.

Pour le calcul des autres impuretés on fait le calcul en prenant compte juste de l'impureté qui a la plus grande surface ;

Surface de la solution témoin (a) × 0.2 → 0.2 %

Surface de la plus grande surface d'impureté → **X**

A.N :

$$703322 \times 0.2 \rightarrow 0.2 \%$$

$$92897 \rightarrow \mathbf{X}$$

$$\mathbf{X = 0.13 \%}$$

Donc le résultat respect la norme

- Somme des impuretés : au maximum 2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) ne dépasse pas 2 %.

$$\text{Surface de la solution témoin (a)} \times 0.2 \rightarrow 0.2 \%$$

$$\text{Somme des surfaces d'impureté} \rightarrow \mathbf{X}$$

A.N :

$$703322 \times 2 \rightarrow 2 \%$$

$$92897 + 55069 \rightarrow \mathbf{X}$$

$$\mathbf{X = 0.2 \%}$$

On remarque que la sommation des composants non reconnue est supérieur à la limite d'exclusion ainsi que leur pourcentage est inférieur à 2 % donc le résultat obtenu respecte les normes.

Signal bruit : $S/N = 13,2$

b) Dosage :

En se basant sur la pharmacopée européenne, et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

❖ **Protocole d'analyse :**

Conditions chromatographiques :

-**Colonne :** lichrospher octadécylsilylé pour chromatographie 10 μ m, l= 0,3 m, \emptyset = 4,6 mm

-**Détection :** spectrophotomètre à 230 nm

-**Débit :** 1,0 ml/min

-**Volume injecté :** 10 μ l

-**Phase mobile :** On mélange 5 volumes de méthanol et 95 volumes d'une solution de phosphate monosodique à 15 g/L, préalablement pH ajusté à 4.0 avec de l'acide phosphorique dilué.

❖ **Préparation des solutions :**

➤ **Solution à examiner :**

On disperse une quantité de clavulanate de potassium dilué correspondant à 50.0 mg de clavulanate de potassium dans une solution d'acétate de sodium à 4.1g/L, préalablement

ajustée à pH 6.0 avec l'acide acétique glacial, on complète à 50.0 ml avec la même solution et on filtre.

➤ **Solution témoin (a) :**

On dissout 50.0 mg de clavulanate de lithium SCR dans une solution d'acétate de sodium à 4.1 g/L, préalablement ajustée à pH 6.0 avec de l'acide acétique glacial, puis on complète à 50.0 ml avec la même solution.

➤ **Solution témoin (b) :**

On dissout 10 mg d'amoxicilline trihydratée SCR dans 10 ml de solution témoin (a).

★ **Procédé**

- Injecter la solution témoin (a) ;
- Injecter la solution témoin (b) pour la conformité de système ;
- Injecter de la solution à analyser ;

★ **Conformité du système**

Résolution : Au minimum 3.5 entre les pics dus au clavulanate (1^{er} pic) et à l'amoxicilline (2^e pic).

★ **Résultats :**

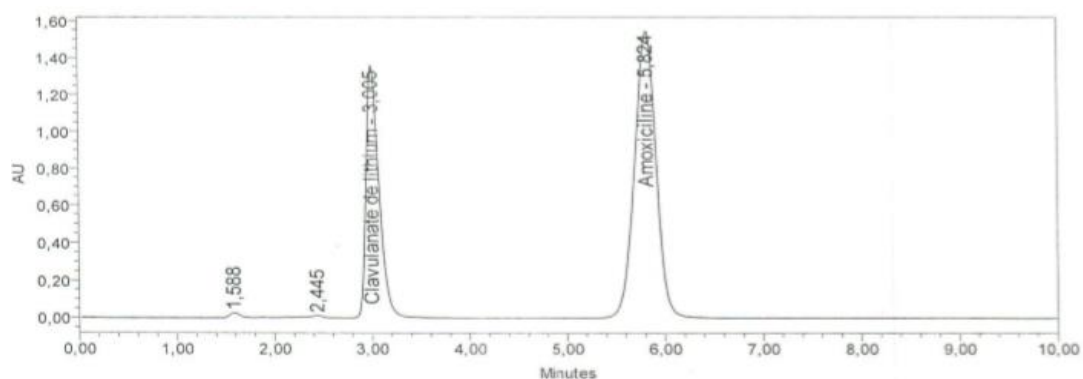


Figure 21 : Chromatogramme de la solution témoin (b) lors du dosage.

Tableau 10 : Résultats de conformité du système (solution témoin b) lors du dosage

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Resolution
1	W2489 ChA 230nr		1,588	205349	0,56	27114	
2	W2489 ChA 230nr		2,445	193891	0,53	12090	3,80
3	W2489 ChA 230nr	Clavulanate de lithium	3,005	12447532	34,19	1364236	2,25
4	W2489 ChA 230nr	Amoxicilline	5,824	23564943	64,72	1547923	8,94

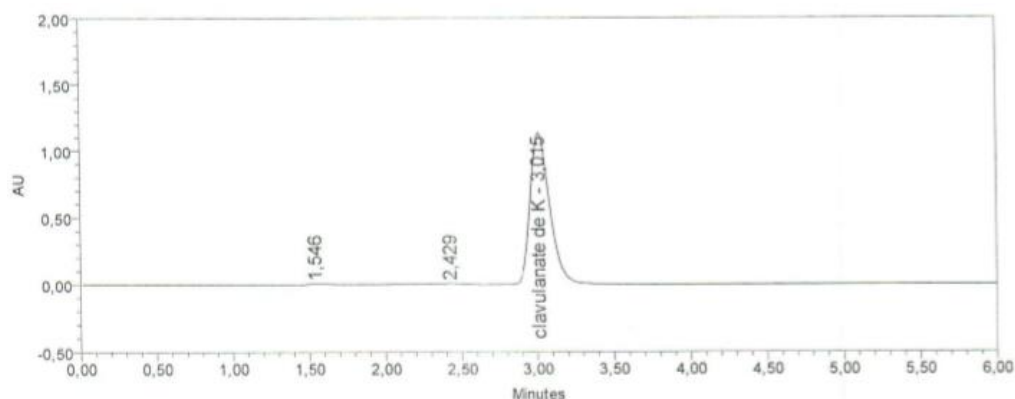


Figure 22 : Chromatogramme de la solution Essai lors du dosage.

Tableau 11 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution essai lors du dosage

	Processed Channel Descr.	Name	RT	Area	% Area
1	W2489 ChA 230nm		1,546	62806	0,61
2	W2489 ChA 230nm		2,429	172123	1,66
3	W2489 ChA 230nm	clavulanate de K	3,015	10128136	97,73

Tableau 12 : Résultats des surfaces de la répétabilité du témoin (a) lors du dosage

	Sample Name	Inj	Channel	Vial	clavulanate de K
1	Témoin a	1	W2489 ChA	3	11692504
2	Témoin a	2	W2489 ChA	3	11650828
3	Témoin a	3	W2489 ChA	3	11609484
4	Témoin a	4	W2489 ChA	3	11642930
5	Témoin a	5	W2489 ChA	3	11532140
6	Témoin a	6	W2489 ChA	3	11463137
Mean					11598504
Std. Dev.					85319
% RSD					0,7

Calcul de la teneur en clavulante de potassium : Normes (40.8%→91.2%)

$$T_{\text{clav}} = \frac{S.E}{S.T} \times \frac{P.T}{P.E} \times \frac{MM(\text{clavK})}{MM(\text{clavLi})} \times \frac{100 \times \text{Titre détalon}}{(100 - T_e)}$$

T : teneur en clavulanate de potassium

S.E : surface d'essai de clavulanate de potassium

S.T : surface du témoin de clavulanate de potassium SCR

P.E : prise d'essai de l'amoxicilline dans la solution à examiner

P.T : prise d'essai de clavulanate de potassium dans la solution témoin (a)

MM : masse molaire du clavulanate de potassium et clavulanate de lithium

Te : teneur en eau de clavulanate de potassium

Titre d'étalon : teneur assignée de clavulanate de potassium SCR

Application numérique :

$$T_{\text{clav}} = \frac{10128136}{11692504} \times \frac{50.2}{102.4} \times \frac{237.3}{205} \times \frac{100 \times 99.0}{(100 - 1.30)}$$

$$T_{\text{clav}} = 50.3\%$$

B-CONTROLE DU PRODUIT FINI

Ce produit fini contient de l'amoxicilline trihydratée et l'acide clavulanique comme principe actif.

I. Contrôle organoleptique

Aspect

Comprimés oblongs de couleur blanc jaunâtre.

II. Masse moyenne expérimentale

Poids individuel de chaque flacon ;

	Poids	Poids moyen
1	11.15 g	11.157g
2	11.08 g	
3	11.13 g	
4	11.15 g	
5	11.09 g	
6	11.27 g	
7	11.23 g	
8	11.22 g	
9	11.10 g	
10	11.15 g	

III. Dosage de l'Axymicine®

Le dosage se fait suivant le mode opératoire décrit dans la pharmacopée Européenne.

a) Protocole d'analyse par HPLC

Condition chromatographiques :

- **Colonne** : Lichrospher RP 18 (250*4mm)
- **Détection** : UV 230nm
- **Débit** : 1.5 ml / min
- **Volume injecté** : 20 µl de chaque solution

-T°c : 25°C

- Phase mobile : solution tampon phosphate pH 5.0 ± 0.1
-acétonitrile (960-40)

b) Préparation des solutions

➤ Solution tampon phosphate pH 5.0 ±0.1 :

On dissout 6.8 g de phosphate monopotassique dans 900 ml d'eau distillée.

On ajuste le pH avec une solution diluée d'hydroxyde de sodium et on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée.

➤ Solution de référence :

Dans une fiole jaugée de 100 ml, on introduit une prise d'essai exactement pesée d'amoxicilline trihydratée de référence correspondant à 0.100 g d'amoxicilline anhydre. On dissout dans l'eau distillée et on complète au volume avec le même solvant. On dilue 5 ml à 10 ml avec de l'eau distillée.

Cette solution doit être utilisée dans les 6 heures qui suivent la préparation.

➤ Solution à analyser :

On pulvérise finement 10 comprimés. Dans une fiole jaugée de 500 ml, on introduit une prise d'essai de poudre à environ MM. On ajoute l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. On agite magnétiquement pendant 1 heure. On filtre sur un filtre plissé.

On dilue 5 ml à 10 ml de l'eau distillée, on filtre sur filtre millipore (0.2 µm)

★ Procédé

-Injecter le blanc ;

- Injecter la solution de référence pour la conformité de système ;

- Injecter de la solution à analyser.

★ Conformité de système :

On injecte 6 fois la solution de référence, le dosage n'est valable que si l'écart type relatif de la surface du pic correspondant à l'amoxicilline n'est pas supérieur à 2%.

★ Résultat :

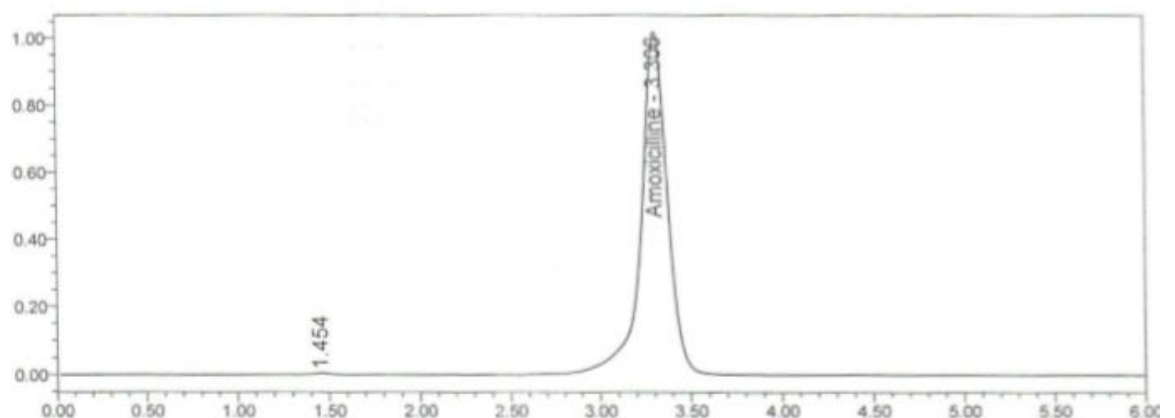


Figure 23 : Chromatogramme de la solution de référence lors du dosage.

	Sample Name	Inj	Channel	Vial	Amoxicilline
1	Temoin	1	W2489 ChA	2	10395967
2	Temoin	2	W2489 ChA	2	10328186
3	Temoin	3	W2489 ChA	2	10317661
4	Temoin	4	W2489 ChA	2	10328711
5	Temoin	5	W2489 ChA	2	10316795
6	Temoin	6	W2489 ChA	2	10292400
Mean					10329953
Std. Dev.					34920
% RSD					0.3

Figure 24 : Résultats de mesures des surfaces de répétabilité de la solution de référence lors du dosage

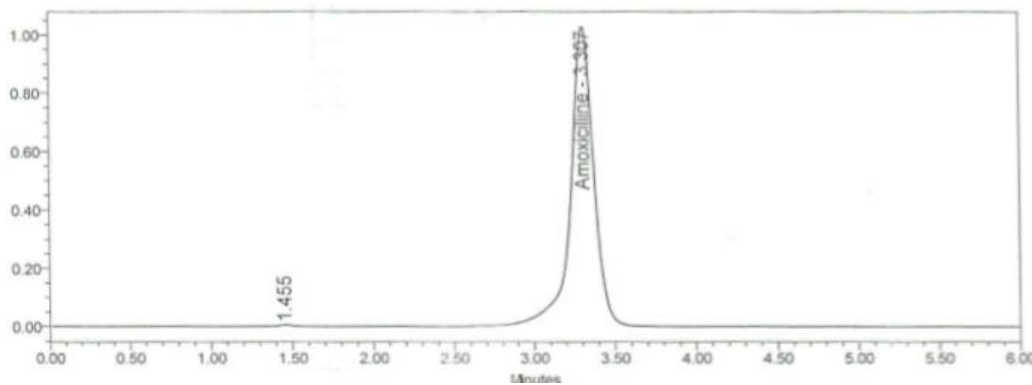


Figure 25 : Chromatogramme de la solution à examiner lors du dosage.

Tableau 13 : Résultats de mesures des surfaces de la solution à examiner lors du dosage

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	System Name
1	W2489 ChA 230nm		1.455	28110	0.27	5161	Alliance_03
2	W2489 ChA 230nm	Amoxicilline	3.307	10393394	99.73	1028216	Alliance_03

Calcul de la teneur en amoxicilline anhydre : Normes 0.475g à 0.525g

La teneur en amoxicilline anhydre exprimée en gramme par comprimé de masse moyenne MM est donnée par la formule suivante :

$$T_{amox} = \frac{S.E}{S.T} \times \frac{P.T}{P.E} \times 5 \times MM \times \text{Titre d'étalon}$$

T : teneur en amoxicilline anhydre

S.E : surface d'essai de l'amoxicilline

S.T : surface du témoin d'amoxicilline SCR

P.E : prise d'essai de l'amoxicilline dans la solution à analyser

P.T : prise d'essai de l'amoxicilline dans la solution de référence

MM : masse moyenne expérimentale

Titre d'étalon : teneur assignée de l'amoxicilline SCR

Application numérique :

$$T_{amox} = \frac{10393394}{10292400} \times \frac{0.1156}{0.6413} \times 5 \times 0.6462 \times \frac{86.33}{100}$$

$$T_{amox} = 0.508 \text{ g}$$

La teneur en principe actif respecte les normes.

IV. Substances apparentées de l'Axymicine®

En se basant sur la pharmacopée européenne, et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) on suit le protocole suivant :

❖ Protocole d'analyse :

Conditions chromatographiques :

- **Colonne :** Lichrospher RP 18 (250*4mm) 10 µm
- **Détection :** UV 254 nm
- **Débit :** 1 ml / min
- **Volume injecté :** 20 µl de chaque solution
- **T°c :** 25°C
- **Phase mobile :**
 - A : 99V Acétonitrile et 1V de solution tampon (pH5,0).
 - B : 80V Acétonitrile et 20V de solution tampon (pH5,0).

Intervalle (min)	Phase mobile A % V/V	Phase mobile B % V/V	Commentaire
0-25	92→0		Gradient linéaire
25-40	0	100	Elution isocratique
40-55	92	8	Rééquilibrage

*On injecte la phase mobile A et on applique le même gradient d'éluion pour obtenir un chromatogramme à blanc.

❖ Préparation des solutions :

➤ Solution tampon pH 5.0

A 250 ml de solution de phosphate monopotassique 0.2 M, on ajoute de la solution diluée d'hydroxyde de sodium en quantité nécessaire pour ajuster à pH 5.0 puis on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée.

➤ Solution à analyser

On pulvérise finement un comprimé. Dans une fiole jaugée de 20 ml, on introduit 100 mg de poudre. On ajoute la phase mobile A jusqu'au trait de jauge. On agite magnétiquement pendant 30 min. On filtre sur un filtre plissé puis sur filtre seringue (0.45 µm).

➤ **Solution de référence (1)**

On dissout 30 mg d'amoxicilline trihydratée de référence dans la phase mobile A et on complète à 20 ml avec le même solvant.

➤ **Solution de référence (2)**

On dilue 0.5 ml de solution de solution de référence (1) à 20 ml avec la phase mobile A.

➤ **Solution de référence (3)**

On dissout 4.0 mg de céfadroxil de référence dans la phase mobile A et on complète à 20 ml avec le même solvant. A 5 ml de solution, on ajoute 5 ml de solution de référence (1) puis on complète à 100 ml avec la phase mobile A.

★ **Procédé**

On injecte la phase mobile A et B comme blanc selon le gradient décrit sous phase mobile ;
On injecte la solution de référence (3) pour la conformité de système ;
On injecte séparément la solution de référence (2) et la solution à analyser récemment préparée.

★ **Conformité de système :**

L'essai n'est valable que si :

-La résolution entre les deux pics principaux n'est pas inférieure à 2 ;

★ **Résultat :**

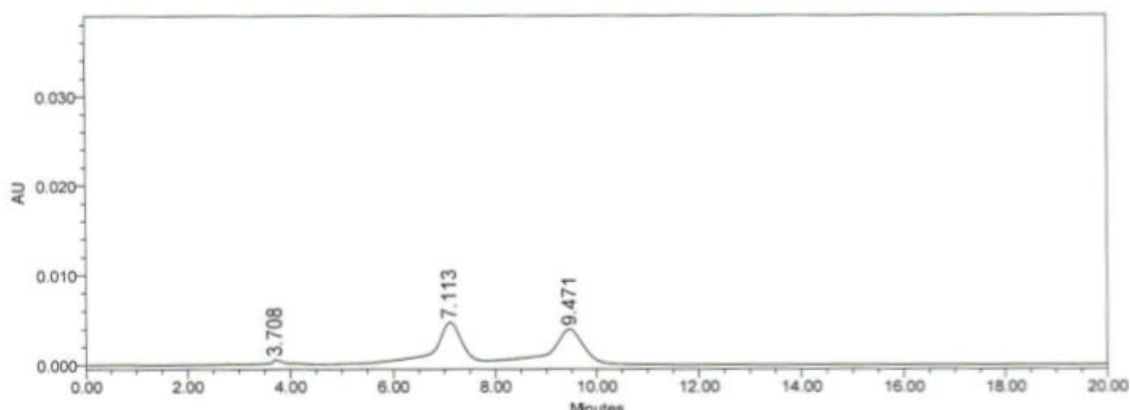


Figure 26 : Chromatogramme de la solution de référence (3) des substances apparentées.

Tableau 14 : Résultats de conformité du système (solution de référence (3)) des substances apparentées

	Processed Channel Descr.	RT	Area	% Area	Height	Resolution
1	W2489 ChA 254nm	3.708	4735	1.88	394	
2	W2489 ChA 254nm	7.113	145656	57.78	4312	6.288012e+000
3	W2489 ChA 254nm	9.471	101717	40.35	3243	2.910767e+000

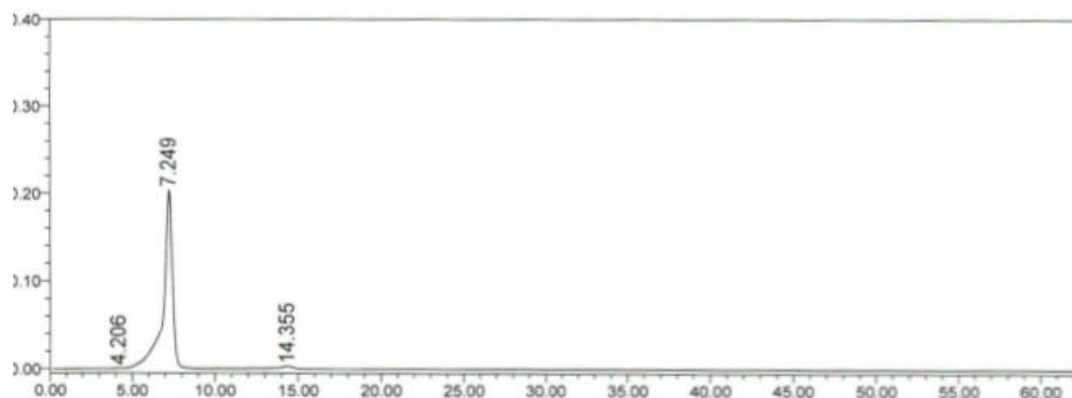


Figure 27 : Chromatogramme de la solution à analyser des substances apparentées.

Tableau 15 : Résultats de mesures (temps de rétention et surface) de la solution à analyser des substances apparentées

	Processed Channel Descr.	RT	Area	% Area	Height
1	W2489 ChA 254nm	4.206	14295	0.18	815
2	W2489 ChA 254nm	7.249	7878525	98.65	203642
3	W2489 ChA 254nm	14.355	93835	1.17	2320

Résolution :

$R_s = 2.9 > 2$; donc elle est conformes aux normes

Calcul et recherche d'impureté :

S'il apparait, dans le chromatogramme obtenu avec la solution à analyser, un pic correspondant aux acides penicilloïques (TR voisin de 5 min), un pic correspondant à l'amoxicilline-2 (R) piperazine-2,5 dione (TR 25 min) et un pic correspondant à l'amoxicilline trimer closed (TR 35 min) la surface d'aucun d'entre eux n'est supérieure à celle du pic principal dans le chromatogramme obtenu avec la solution de référence (2) :

Norme $\leq 1\%$

- **Acides penicilloïques (TR = 4.206) :**

107540 \rightarrow 1%

14295 \rightarrow X

$$X = 0.13\% < 1\%$$

\rightarrow conforme aux normes

- **Amoxicilline-2 (R) piperazine-2,5 dione (TR = 25 min) : 0%**
- **Amoxicilline trimer closed (TR = 35 min) : 0%**

S'il apparait, dans le chromatogramme obtenu avec la solution à analyser, un pic correspondant à l'amoxicilline trimer open (TR voisin de 30 min) sa surface n'est pas supérieure à celle du pic principal dans le chromatogramme obtenu avec la solution de référence (2) : **Norme $\leq 1\%$**

- **Amoxicilline trimer open : 0%**

S'il apparaît, dans le chromatogramme obtenu avec la solution à analyser, d'autres pics que le pic principal de l'amoxicilline, un pic dû aux acides penicilloïques, un pic dû à l'amoxicilline-2 (R) piperazine-2,5 dione, un pic dû à l'amoxicilline trimer closed et un pic dû à l'amoxicilline trimer open, la surface d'aucun d'entre eux n'est supérieure à celle du pic principal dans le chromatogramme obtenu avec la solution de référence (2) : **Norme $\leq 1\%$**

- **Amoxicilline trimer open : 0%**
- **Autre impureté : 0%**

La somme de la surface de tous les pics à l'exception du pic principal de l'amoxicilline, dans le chromatogramme obtenu avec la solution à analyser n'est pas supérieure à 2 fois la surface du pic principal dans le chromatogramme obtenu avec la solution de référence (2) : **Norme $\leq 2\%$**

*Ne pas tenir compte des pics dus au solvant ni du pic dont le temps de rétention est voisin de 17 min (saccharine sodique).

$$2 \times 107540 \rightarrow 2\%$$

$$14295 \rightarrow X$$

$$X = 0.13\% < 2\%$$

→ Donc le résultat est conforme.

Désagrégation : Normes < 3 min

Les comprimés dispersibles doivent se désagréger dans l'eau à 15-25°C en moins de 3 min, temps prescrit à la Pharmacopée Européenne.

	Temps de désagrégation
1	1 min 38s
2	1 min 41s
3	1 min 49s
4	1 min 55s
5	1 min 59s
6	2 min 03s

Teneur en eau : Normes $\leq 14,5\%$

⇒ **$T_e = 12,61\%$**

Conclusion générale

En terme de ce stage, j'ai pu mettre en pratique mes connaissances théoriques acquises durant ma formation. Après mon intégration dans l'équipe du travail, j'ai eu l'occasion de réaliser plusieurs tâches qui ont constitué une mission globale de stage.

En effet, tous les contrôles physico-chimiques effectués sur le médicament étudié dès la matière première jusqu'au produit fini ont montré une conformité aux normes exigées par la Pharmacopée européenne (édition en vigueur), j'ai ainsi réalisé :

- La spectrophotométrie d'absorption par infrarouge est une technique qui permet l'identification par comparaison avec un spectre de référence. Elle fournit des informations très complètes comme preuve de l'identité du principe actif.
- L'étude des produits finis par HPLC a permis l'identification des principes actifs de ces derniers, de déterminer la teneur des comprimés en leurs propres principes actifs, ainsi que la recherche et dosage des impuretés dans la solution à examiner indésirables qui peuvent causer des toxicités s'ils dépassent les normes.
- Le titrateur Karl Fischer nous a servi pour définir la teneur en eau des comprimés et des MP contrôlés.
- L'appareil de désagrégation a permis de préciser le temps pendant lequel le produit fini analysé se désagrège.

Les produits contrôlés étant tous valides et conformes aux normes, ils sont donc tous autorisés à être mis sur le marché.

Année Universitaire : 2018-2019

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Recherche des impuretés dans les produits pharmaceutiques

Présenté par :

Mme CHRAIBI Chaimae

Encadré par :

Pr. A. MELIANI

Soutenu Le 18 juin 2019 devant le jury composé de :

Pr. A. MELIANI

Pr. H. MISBAHI

Pr. H. GRECHE

Stage effectué à : LAPROPHAN MAROC

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom : CHRAIBI Chaimae

Année Universitaire : 2018/2019

Titre : Recherche des impuretés dans les produits pharmaceutiques

Résumé

Le contrôle des différents constituants d'un médicament est une activité de routine pour les laboratoires de contrôle de qualité au sein de l'entreprise LAPROPHAN.

L'évaluation de la conformité se fait selon le protocole de la pharmacopée européenne.

Les substances pharmaceutiques sur lesquelles on a effectué les essais et les dosages ainsi que l'identification des impuretés toxiques ou non toxiques répondent aux normes décrites dans les spécifications données par la Pharmacopée européenne pour le contrôle de la qualité des médicaments.

Mots clés : médicaments, impuretés, antibiotiques.

كلية العلوم والتقنيات فاس
+οϋΣΠοι+ | +CοΘοοισι Λ +ΟΙΣΧΣ+ΣΙ
Faculté des Sciences et Techniques de Fès



جامعة سيدي محمد بن عبد الله
+οΘΛοΠΣ+ ΟΣΛΣ C8ΛCΓοΛ ΘΙ ΗΘΛ8ИИοΦ
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah