

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mohamed Seddik Ben Yahia – JIJEL



Faculté des Sciences Exactes et Informatiques

Département de chimie

Mémoire de Fin d'Etude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie

Option : Chimie Pharmaceutique



Thème

**Développement et validation de deux méthodes d'analyse, CLHP
et spectrophotométrie, pour la détermination de Glibenclamide
dans le dosage des formes pharmaceutiques solides**

Présenté par :

- M^{elle} Meriem LOUADJ
- M^{elle} Amel MANSOUR

Soutenu le 28 juin 2016

Devant le Jury:

- Mr. Kamel HARROUCHE
- M^{me} Nadia MACHOUCHE
- M^{elle} Meriem KEMEL

Encadreur
Présidente
Examinatrice

Université de Jijel
Université de Jijel
Université de Jijel

Année universitaire 2015/2016

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mohamed Seddik Ben Yahia – JIJEL



لا يعار.
Exclus du Prêt.

M. chi. Phor. 10/16

Faculté des Sciences Exactes et Informatiques

Département de chimie

Mémoire de Fin d'Etude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie

Option : Chimie Pharmaceutique

Thème

**Développement et validation de deux méthodes d'analyse, CLHP
et spectrophotométrie, pour la détermination de Glibenclamide
dans le dosage des formes pharmaceutiques solides**

Présenté par :

- M^{elle} Meriem LOUADJ
- M^{elle} Amel MANSOUR

Soutenu le 28 juin 2016

Devant le Jury:

- Mr. Kamel HARROUCHE
- M^{me} Nadia MACHOUCHE
- M^{elle} Meriem KEMEL

Encadreur
Présidente
Examinatrice

Université de Jijel
Université de Jijel
Université de Jijel

Dédicace

Nous aimerons dédier ce travail ...

A nos très chers parents,

A ceux que nous aimons les plus au monde. A ceux qui nous avons tout donné sans compter. Vous avez été pour nous tout au long de nos études le plus grand symbole d'amour de dévouement qui n'avons ni cessé ni diminué.

En ce jour, nous espérons réaliser l'un de vos rêves, et nous espérons ne jamais vous décevoir, ni trahir votre confiance.

Que dieu vos garde et procure santé, bonheur, et long vie.

A nos très chères sœurs et frères,

Pour tous les bons moments passés ensemble.

Que dieu vous protège et vous offre un avenir plein de succès, de bonheur, et de santé.

A toutes nos familles,

Nous vous dédie ce travail en vous souhaitant tout le bonheur du monde.

A mes amies et ceux qui me sont chères,

Nous vous dédie ce travail avec mes sentiments les plus sincères, en mémoire de tous les moments agréables vécus ensemble.

Amel et Meriem

Remerciement

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au niveau de laboratoire de chimie, de la faculté des sciences exactes et informatiques de l'université de Jijel.

Nous venons en premier lieu remercions « ALLAH » qui nous ont donné la force, le courage et la patience pour terminer et d'avoir réussi dans nos études.

Nous remercions nos famille plus particulièrement nos parents pour leur soutien permanent tout au long de ce mémoire et plus généralement au long de notre vie universitaire.

Nous aimerons aussi remercier Mr Kamel Harrouche pour nous avoir proposé le sujet, soutenu par ses conseils, ses encouragements et ses connaissances.

Nos remerciements vont aux membres de jury: M^{me} Mechouche Nadia d'avoir bien voulu accepter de présider le jury et M^{elle} Kemel Meriem d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Nous adressons également notre profonde reconnaissance aux enseignants de département de chimie.

Nous tenons à remercier vivement les membres du laboratoire pédagogique et en particulièrement M^{elle} Tawhida.

Nous tenons aussi à dire un immense merci à tous nos collègues de promotion 2016, à nos amies « Amel, Basma, Ines, Karima, Meriem, Wafa et Sabah ».

Enfin, nous adressons nos remerciements à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Sommaire

Dédicace

Remerciements

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale.....	01
Partie I : Recherche bibliographique.....	02
Chapitre 1 : Pharmacologie du diabète.....	02
I. Généralité.....	02
II. L'insuline.....	02
II.1. L'anatomie du pancréas.....	04
II.2. La structure de l'insuline.....	04
II.3. La biosynthèse de l'insuline.....	05
II.4. La sécrétion de l'insuline.....	06
III. Le diabète.....	06
III.1. Classification.....	06
III.1.1. Diabète de type I.....	06
III.1.2. Diabète de type II.....	07
III.2. Traitement de diabète.....	07
III.2.1. Traitement de diabète de type I.....	07
III.2.2. Traitement de diabète de type II.....	08
III.2.2.1. Les sulfamides hypoglycémiantes.....	10
III.2.2.2. Les biguanides.....	11
III.2.2.3. Les inhibiteurs α -glucosidases.....	13
III.2.2.4. Les glinides.....	14
III.2.2.5. Les thiazolidinediones.....	16
Chapitre 2 : Techniques de dosage des médicaments.....	16
I. Méthode de dosage par la spectrophotométrie.....	16
I.1. Généralité.....	16
I.2. Spectrophotométrie UV-visible.....	16

I.2.1. Principe.....	17
I.2.2. Application.....	17
II. Méthode de dosage par la chromatographie.....	18
II.1. Généralité.....	18
II.2. Chromatographie liquide à haute performance.....	18
II.2.1. Principe.....	18
II.2.2. Domaines d'application de CLHP.....	19
II.2.3. Appareillages de la CLHP.....	19
II.2.3.1. Réservoir de la phase mobile.....	19
II.2.3.2. La pompe.....	19
II.2.3.3. L'injecteur.....	20
II.2.3.4. La colonne.....	20
II.2.3.5. Le détecteur.....	21
Chapitre 3 : Critères de validation d'une méthode d'analyse.....	22
I. Définition de validation	22
II. Critères de la validation.....	22
II.1. Le domaine de linéarité.....	22
II.2. La limite de détection.....	22
II.3. La limite de quantification.....	23
II.4. La justesse.....	23
II.5. La fidélité.....	23
II.6. L'exactitude.....	23
II.7. La spécificité.....	24
II.8. La sensibilité.....	24
II.9. La robustesse.....	24
Partie II : Protocoles expérimentaux.....	25
I. Introduction.....	25
II. Solvants et produits chimiques.....	25
III. Matériels utilisés.....	25
IV. Méthodes d'analyse.....	25
IV.1. Etude chromatographique CLHP.....	25
IV.1.1 Appareillage.....	25
IV.1.2. Recherche des conditions optimales.....	26
IV.2. Etude spectrophotométrique UV-visible.....	27

V. Préparation des solutions.....	28
V.1. Préparation du tampon de la phase mobile.....	28
V.2. Préparation de la solution mère.....	28
V.3. Préparation des solutions filles.....	28
V.4. Préparation de l'échantillon.....	29
VI. Procédure de la validation.....	29
VI.1. La linéarité.....	30
VI.2. La fidélité.....	30
VI.3. L'exactitude.....	30
VI.4. La robustesse.....	30
Partie 3 : Résultats et discussions	32
I. Optimisation des conditions chromatographique.....	32
II. Validation de la méthode développée.....	33
II.1. La linéarité.....	33
II.2. La fidélité.....	35
II.3. La justesse.....	38
II.4. La limite de détection.....	39
II.5. La limite de quantification.....	40
II.6. L'exactitude.....	40
II.7. La robustesse.....	41
Conclusion générale.....	43

Références

Résumé

Liste des abréviations

ADO : Antidiabétiques oraux

ATP : Adenosine-5'-triphosphate

Ca²⁺ : Ion de calcium

OMS : Organisation mondiale de la santé

DID : Diabète insulino-dépendant

DNID : Diabète non insulino-dépendant

SUR : Sulfonylurée récepteur

KATP : Canaux potassiques dépendant à l'ATP

PPAR γ : Peroxysome proliferator activated receptors gamma

Glut : Transporteur de glucose

ARNm : Acide ribonucléique messenger

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CL : Chromatographie liquide

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

IR : Infrarouge

UV : Ultraviolet

RMN : Résonance magnétique nucléaire

LD : Limite de détection

LQ : Limite de quantification

SM : Solution mère

SF : Solution fille

IC : Intervalle de confiance

ICH : International conférence en harmonisation

SD : Déviation standard

RSD : Déviation standard relative

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats du test de précision par spectrophotométrie UV-Visible.....	35
Tableau 2 : Résultats du test de répétabilité par spectrophotométrie UV-Visible.....	36
Tableau 3 : Résultats du test de fidélité intermédiaire par spectrophotométrie UV-Visible.....	36
Tableau 4 : Résultats de la précision par CLHP.....	37
Tableau 5 : Résultats du test de répétabilité par CLHP.....	37
Tableau 6 : Résultats du test de fidélité intermédiaire par CLHP.....	38
Tableau 7 : Résultats du test d'intra-jour par spectrophotométrie UV-Visible.....	38
Tableau 8 : Résultats du test d'inter-jour par spectrophotométrie UV-Visible.....	38
Tableau 9 : Résultats du test d'intra-jour par CLHP.....	39
Tableau 10 : Résultats du test d'inter-jour par CLHP.....	39
Tableau 11 : Résumé des données d'exactitude par spectroscopie UV-Visible.....	40
Tableau 12 : Résumé des données d'exactitude par CLHP.....	41
Tableau 13 : Résumé des résultats du test de robustesse par CLHP.....	41

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du pancréas.....	03
Figure 2 : Représentation schématique d'un ilot de Langerhans pancréatique.....	03
Figure 3 : Structure de la molécule d'insuline.....	04
Figure 4 : La biosynthèse de l'insuline.....	05
Figure 5 : La sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques.....	06
Figure 6 : Injecteurs d'insuline.....	07
Figure 7 : Sites d'action des antidiabétiques oraux.....	08
Figure 8 : Les structures chimiques de quelques molécules de première génération.....	08
Figure 9 : Les formules chimiques des quelques molécules de deuxième génération.....	09
Figure 10 : Mécanisme d'action des sulfamides hypoglycémiantes.....	10
Figure 11 : Les structures chimiques des trois dérivés biguanidine.....	10
Figure 12 : Mécanisme d'action des biguanides.....	11
Figure 13 : Les structures chimiques de deux molécules inhibitrices α -glucosidases.....	12
Figure 14 : Mécanisme d'action des inhibiteurs α -glucosidases.....	12
Figure 15 : Les structures chimiques de deux molécules des glinides.....	13
Figure 16 : Mécanisme d'action des glinides.....	13
Figure 17 : Le groupe pharmacophore des dérivés thiazolidinediones.....	14
Figure 18 : Les structures chimiques de deux molécules des glitazones.....	14
Figure 19 : Mécanisme d'action des glitazones.....	15
Figure 20 : Spectre électromagnétique de la lumière et domaine UV-Visible.....	16

Figure 21 : Principe fonctionnement de l'UV-Visible.....	17
Figure 22 : Principe de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire.....	18
Figure 23 : Principe de fonctionnement de la CLHP.....	19
Figure 24 : Structure de gel de silice.....	20
Figure 25 : Structure de gel de silice greffée.....	21
Figure 26 : Appareil CLHP Perkin Elmer.....	26
Figure 27 : Quelques chromatogrammes obtenus par CLHP.....	27
Figure 28 : Appareil spectrophotomètre UV-Visible SECOMAM.....	28
Figure 29 : Gamme d'étalon de Glibenclamide (SF).....	29
Figure 30 : La formule chimique de Glibenclamide.....	29
Figure 31 : Chromatogramme d'acétonitrile/tampon phosphate (60/40).....	32



*Introduction
générale*

Introduction :

L'utilisation des médicaments peut avoir des conséquences graves en termes de santé publique et de sécurité, c'est la raison pour laquelle les conditions de commercialisation des médicaments diffèrent considérablement de celles des autres biens de consommation.

L'assurance de la qualité des médicaments regroupe toutes les mesures prises pour garantir qu'un médicament est sûr, efficace, de bonne qualité et acceptable pour le patient (depuis l'étape de sa mise au point jusqu'à son utilisation par le patient). Ce qui nécessite le développement et la validation des procédures analytiques qui établissent que la méthode analytique convient pour son utilisation prévue et par conséquent de prouver la fiabilité des résultats obtenus dans des limites bien définies.

Notre objectif dans ce travail vise à développer et optimiser deux méthodes analytiques pour le dosage d'un principe actif (Glibenclamide) dans un médicament commercial sous forme solide (comprimé) de la classe des antidiabétiques oraux.

Le présent travail est divisé en trois parties dont la première partie est consacrée à la recherche bibliographique autour de la pharmacologie du diabète, les techniques de dosage des médicaments et les critères de la validation d'une méthode analytique, la deuxième partie comporte les protocoles expérimentaux suivis. La troisième partie contient les résultats de validation et d'optimisation des deux méthodes analytiques pour le dosage de Glibenclamide à savoir :

- Méthode de dosage par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)
- Méthode de dosage par spectrophotométrie UV-Visible.

En fin une conclusion générale.

Partie I :
Recherche
bibliographique

Chapitre 1 :
Pharmacologie du
diabète

Partie I : Recherche bibliographique

Chapitre 1 : Pharmacologie du diabète

I. Généralité :

Le glucose est le substrat énergétique des cellules, il est métabolisé en CO_2 et H_2O et permet la formation des molécules d'ATP. Le glucose sanguin a deux origines : une origine exogène représentée par l'apport alimentaire et une origine endogène constituée essentiellement par le glycogène hépatique et musculaire qui est dégradé par la voie de la glycogénolyse. Au niveau hépatique, le glucose peut se former également à partir des molécules telles que le glycérol, le lactate et les acides aminés glucoformateurs. On parle alors de la néoglucogenèse.

La concentration de glucose dans le sang définit par la glycémie est environ 1g/l (entre 0,8 g/l et 1,2 g/l). En cas d'une hyperglycémie, la glycémie est régulée par l'insuline (hormone hypoglycémiant sécrétée par les cellules β pancréatiques). Par contre en cas d'une hypoglycémie, elle est régulée par le glucagon (hormone antagoniste de l'insuline, sécrétée par les cellules α pancréatiques) [1].

II. L'insuline :

L'insuline est une hormone hypoglycémiant, joue un rôle fondamental dans la diminution du taux de sucre sanguin (glycémie). Elle est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas qui permet au glucose de pénétrer dans les cellules de l'organisme où il est transformé en énergie [2].

II.1. L'anatomie du pancréas :

Le pancréas est une glande à sécrétion endocrine et exocrine, c'est-à-dire qu'il sécrète des hormones déversées dans le sang et des enzymes digestives déversées dans le duodénum (Figure 1) [3].

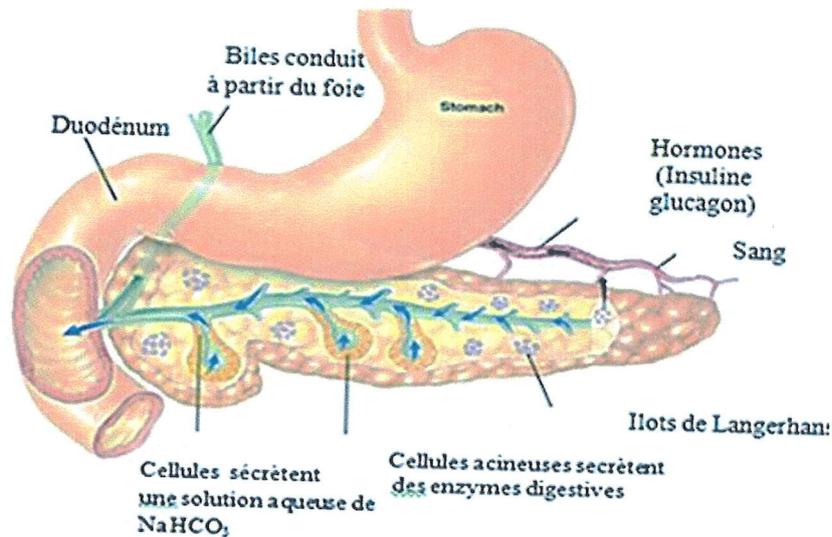


Figure 1. Représentation schématique du pancréas

Les îlots de Langerhans composés des amas de cellules dispersés dans tout le pancréas.

Il y a quatre types des cellules sécrétrices d'hormone composent ces îlots :

- Les cellules α qui sécrètent le glucagon.
- Les cellules β qui sécrètent l'insuline.
- Les cellules δ qui sécrètent la somatostatine (hormone d'inhibition de l'hormone de croissance).
- Les cellules F qui sécrètent le polypeptide qui régularisent la libération des enzymes digestives pancréatiques (Figure 2) [4].

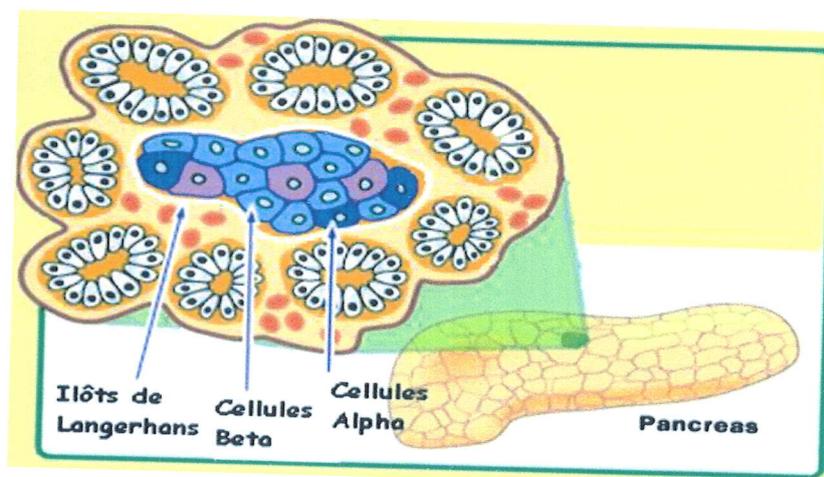


Figure 2. Représentation schématique d'un îlot de Langerhans pancréatique

II.2. La structure de l'insuline :

L'insuline est une hormone polypeptidique comportant deux chaînes distinctes A et B ; la chaîne A consisté 21 résidus d'acide aminé, et la chaîne B en contient 30 chez les mammifères, les deux chaînes sont liées par des ponts disulfures entre les acides aminées cystéines. Les chaînes A et B isolées n'ont pas d'activités hormonales (Figure 3) [3].

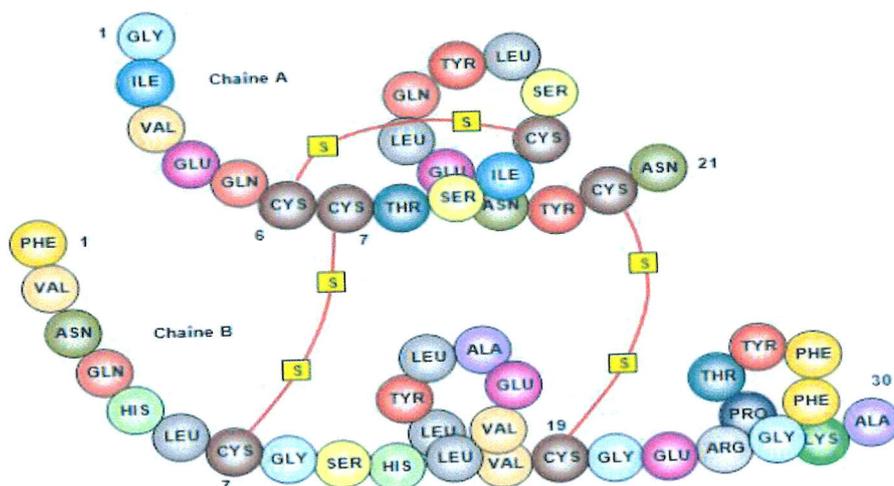


Figure 3. Structure de la molécule d'insuline

II.3. La biosynthèse de l'insuline :

La biosynthèse s'effectue uniquement au niveau des cellules β des îlots de Langerhans. En fait, le produit initial de la traduction d'ARN_m de l'insuline est la pré-pro-insuline constituée d'une seule chaîne peptidique. Les 25 premiers acides aminés de la molécule sont des résidus hydrosolubles (on obtient la pro-insuline) qui permettent la pénétration rapide du peptide en cours de synthèse dans le réticulum endoplasmique rugueux. La pro-insuline quitte en suite le réticulum endoplasmique rugueux, stockée dans des microvésicules et rejoint l'appareil de Golgi. Puis elle quitte l'appareil de Golgi dans des vésicules et subissent une acidification de leur contenu et la pro-insuline est clivée par des enzymes pour produire l'insuline et le peptide C. Elles sont sécrété par exocytose, il y a alors libération molaire de l'insuline et de peptide C (ne possède aucune fonction physiologique) (Figure 4) [5].

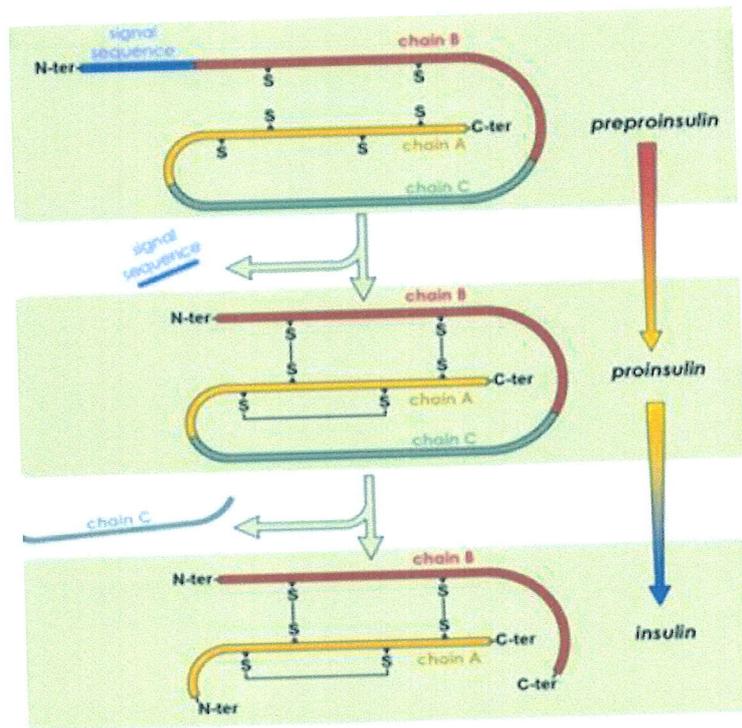


Figure 4. La biosynthèse de l'insuline

II.4. La sécrétion de l'insuline :

La sécrétion d'insuline est étroitement contrôlée par la cellule β . L'insuline est sécrétée en réponse à l'augmentation de la concentration plasmatique de glucose [6]. Le transfert du glucose aux cellules β par diffusion passive faisant intervenir le transporteur Glut 2 est suivi d'une étape de phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate par l'enzyme glucokinase. Une augmentation du glucose intracellulaire favorise la production d'ATP intracellulaire par phosphorylation oxydative. L'ATP bloque les canaux potassiques ATP dépendant, ce qui conduit ultimement à une dépolarisation de la membrane et résulte l'ouverture des canaux calciques voltage dépendant et l'entrée de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. L'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} initialise la libération d'insuline (Figure 5) [7].

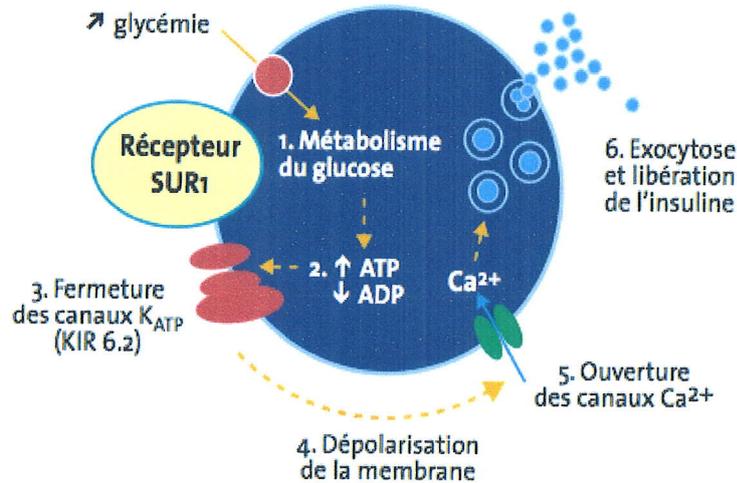


Figure 5. La sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques

III. Le diabète :

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète est une affection métabolique caractérisée par la présence d'une hyperglycémie chronique résultant d'une déficience de sécrétion d'insuline, d'anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles, ou de l'association des deux [1].

III.1. Classification :

La classification du diabète fut évaluée depuis 50 années. En effet, en 1980, l'OMS considérait, comme la plupart des cliniciens, qu'il y a avait deux classes principales de diabète : diabète de type I ou diabète insulino-dépendant (DID) et diabète de type II ou diabète non insulino-dépendant (DNID) [1].

III.1.1. Le diabète de type I :

Le diabète de type I résulte des effets synergiques de facteurs génétiques, environnementaux et immunologiques qui finissent par détruire les cellules sécrétrices d'insuline, les cellules β , des îlots de Langerhans pancréatiques [8]. Il atteint surtout les sujets jeunes moins de 20 ans [3].

III.1.2. Le diabète de type II :

Le diabète de type II représente 85 à 90% des diabétiques. La maladie est souvent diagnostiquée chez les sujets adultes ou âgés et très souvent associée à un excès pondéral ou une obésité franche. La composante génétique y est certaine. Des études ont mis en

évidence des anomalies de l'insulinosécrétion et des anomalies de la sensibilité à l'insuline (insulinorésistance) [9].

Le diabète gestationnel est un type particulier de diabète secondaire, se caractérise par l'apparition ou la reconnaissance de l'intolérance au glucose observée au cours de la grossesse [1].

III.2. Traitement du diabète :

III.2.1. Traitement de diabète de type I:

La carence en insuline est la caractéristique principale du diabète de type I. L'insulinothérapie est le principal traitement du diabète de type I. Il s'agit d'un traitement substitutif par l'insuline exogène dont le but est de se rapprocher de la courbe de sécrétion physiologique d'insuline.

- ✓ Soit par l'utilisation de bolus d'insuline ultrarapide.
- ✓ Soit par l'utilisation d'une pompe portable perfusant par voie sous-cutanée (Figure 6) [10].



Figure 6. Injecteurs d'insuline

III.2.2. Traitement de diabète de type II :

Les hypoglycémiantes oraux sont le troisième volet du traitement du diabète non insulino-dépendant, après la diététique et l'activité physique. Il existe actuellement cinq familles d'hypoglycémiantes oraux (Figure 7) :

- ✓ Les sulfamides hypoglycémiantes ;
- ✓ Les biguanides ;
- ✓ Les inhibiteurs α -glucosidases ;
- ✓ Les glinides ;
- ✓ Les thiazolidinediones (les glitazones) [3].

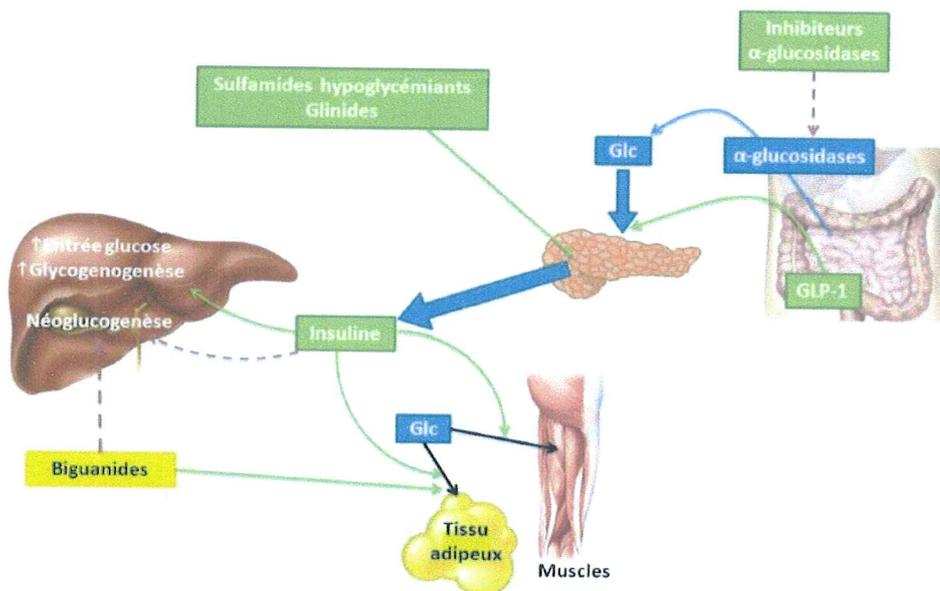


Figure 7. Sites d'action des antidiabétiques oraux

III.2.2.1. Les sulfamides hypoglycémiant :

Les sulfamides appartiennent chimiquement à la famille des sulfonylurées [11], ont été découverts en 1942 et leur utilisation a débuté avec le Carbutamide en 1955 [12].

Ils peuvent être classés en fonction de leur ancienneté, de leur pouvoir hypoglycémiant ou de leur demi-vie à :

- Les sulfamides de première génération : Carbutamide, Chlorpropamide, Tolbutamide ont une demi-vie longue, sont fortement dosés et ont une faible activité (Figure 8) [9].

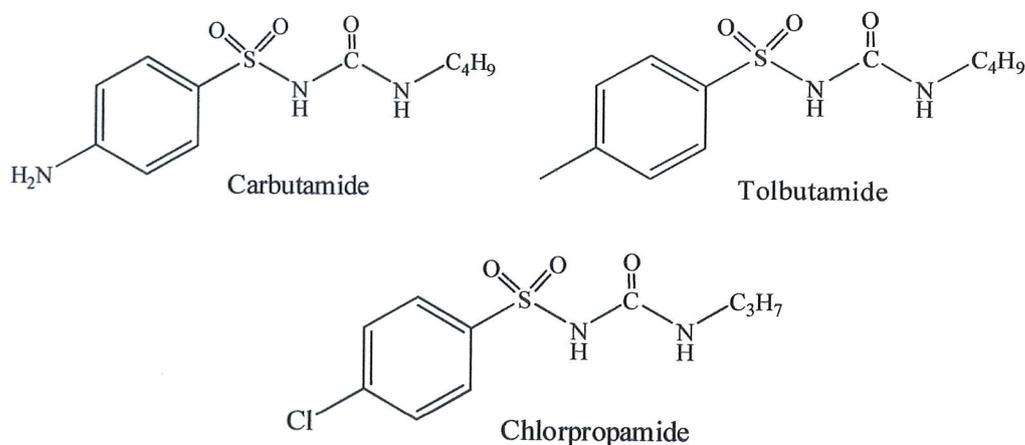


Figure 8. Les structures chimiques de quelques molécules de première génération

- Les sulfamides de deuxième génération : Glipizide, Glibenclamide et Glimepiride ont une demi-vie brève, sont actifs en faible dose et ont un pouvoir hypoglycémiant plus important (Figure 9) [9].

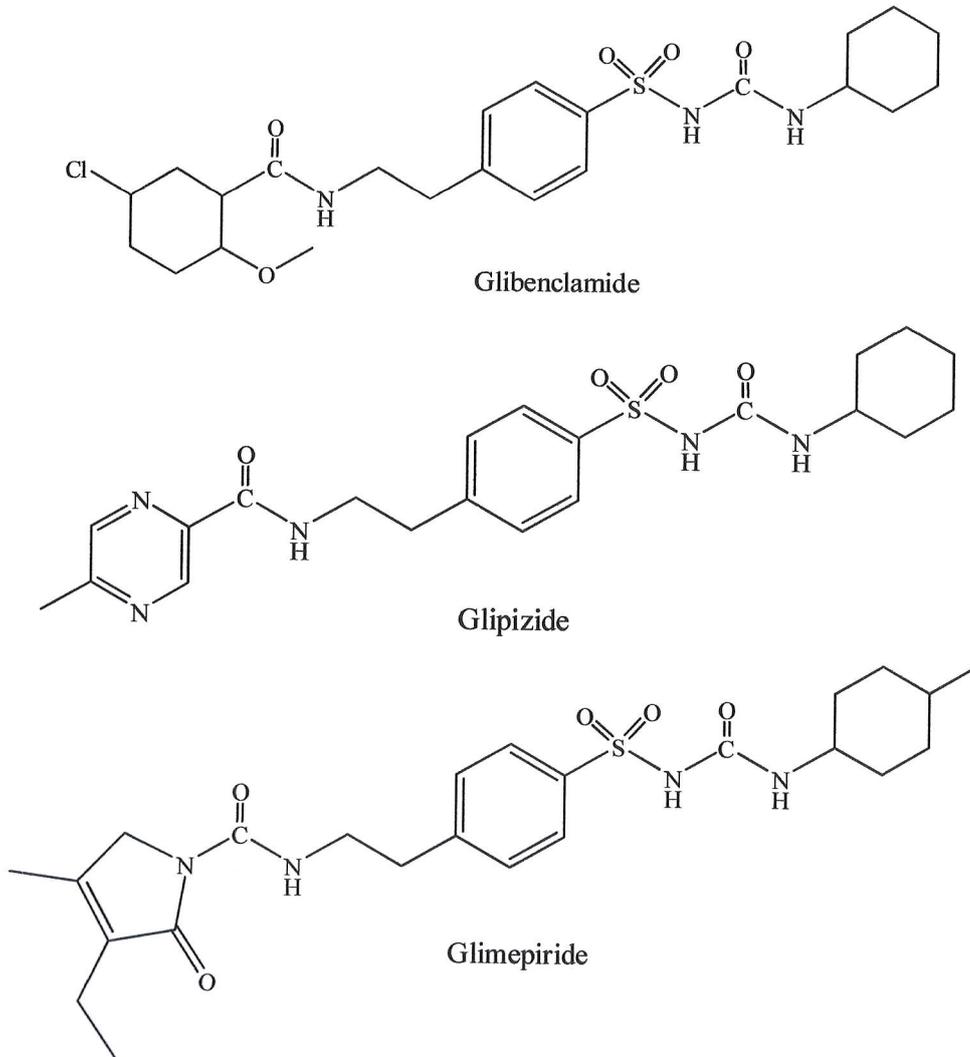


Figure 9. Les formules chimiques des quelques molécules de deuxième génération

Mode d'action :

Les sulfamides hypoglycémiant agissent essentiellement en stimulant la sécrétion d'insuline (sans influencer sa synthèse) par les cellules β des ilots de Langerhans pancréatiques. Ils se lient à une protéine membranaire appelée SUR, la liaison des sulfonylurées à leur récepteurs spécifiques provoquant la fermeture des canaux K_{ATP} dépendants au niveau de membrane cellulaire, la fermeture de ces canaux potassiques induit une dépolarisation de la membrane, entraînant l'ouverture des canaux calciques voltage dépendent qui augmente la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. L'afflux de Ca^{2+} dans le cytoplasme des cellules β pancréatiques induit l'exocytose des vésicules contenant

l'insuline d'une façon similaire à celle observée après stimulation par le glucose (Figure 10) [12].

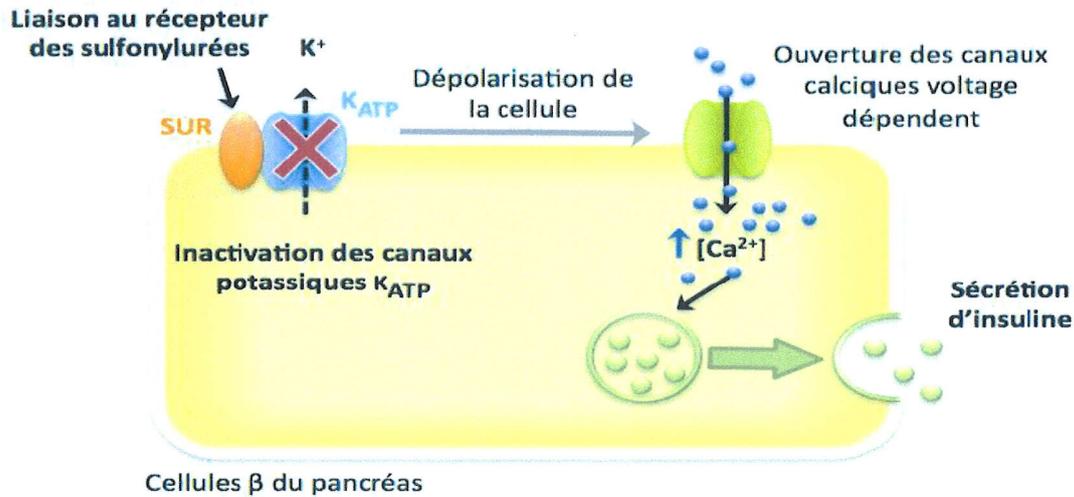


Figure 10. Mécanisme d'action des sulfamides hypoglycémiantes

III.2.2.2 Les biguanides :

Dérivée de la biguanidine dont l'effet hypoglycémiant a été découvert en 1918. Il existe trois dérivés de la biguanidine, la Phenformine, la Buformine et la Metformine (diméthylbiguanide). Seule la Metformine a été maintenue (Figure 11) [9].

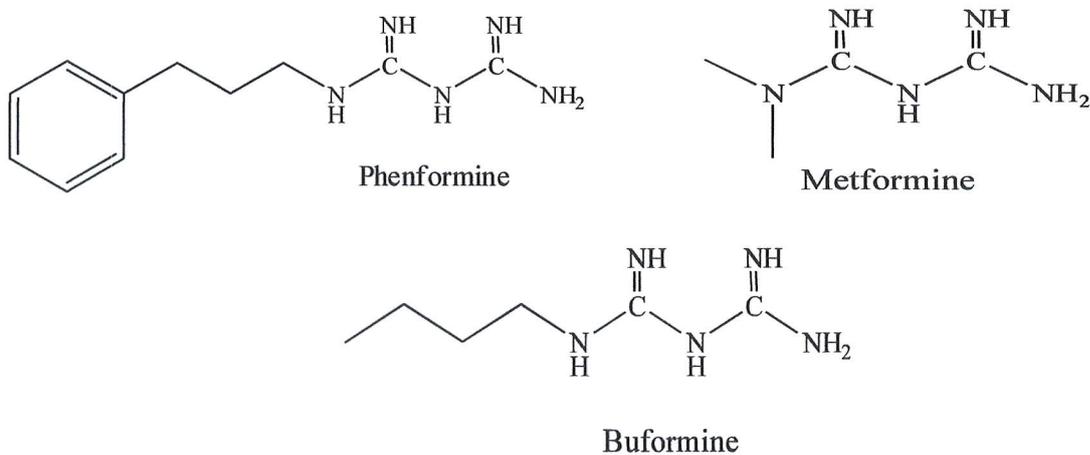


Figure 11. Les structures chimiques des trois dérivés biguanidine

Mode d'action :

La Metformine n'agit pas sur la sécrétion d'insuline évitant le risque d'hypoglycémie. Son action nécessite la présence d'insuline. Il y a par ailleurs une augmentation de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline. En particulier les muscles et le foie.

- Au niveau musculaire, elle favorise la consommation cellulaire du glucose. Il s'en suit une augmentation du glycogène par stimulation de l'action du glycogène synthase et une diminution de la glycémie post prandiale.

- Au niveau hépatique, elle diminue la production de glucose en freinant la néoglucogenèse et en réduisant le glycogénolyse.

Par ailleurs l'inhibition des enzymes de la chaîne respiratoire au niveau des mitochondries conduit à une inhibition de la glycolyse aérobie stimulant la glycolyse anaérobie. Cela conduit à une augmentation de la consommation périphérique du glucose (Figure 12) [13].

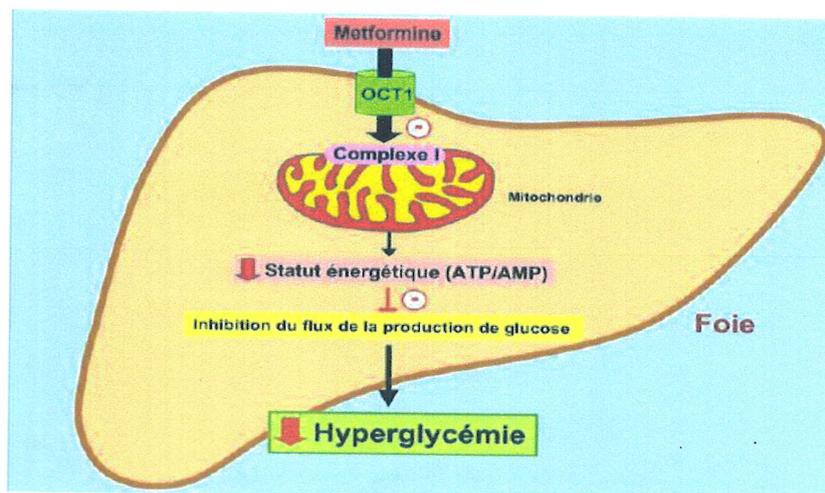


Figure 12. Mécanisme d'action des biguanides

III.2.2.3. Les inhibiteurs α -glucosidases :

Les inhibiteurs α -glucosidases tels l'Acarbose et le Migitol sont des pseudotétracosaccharides d'origine bactérienne [11]. Ils ont pour indication le traitement de DNID en complément du régime alimentaire, en monothérapie ou en association avec d'autres antidiabétiques oraux. Ils sont hypoglycémiant plus faible que celle des sulfamides hypoglycémiant et des biguanides, sont surtout efficaces sur la glycémie (Figure 13) [14].

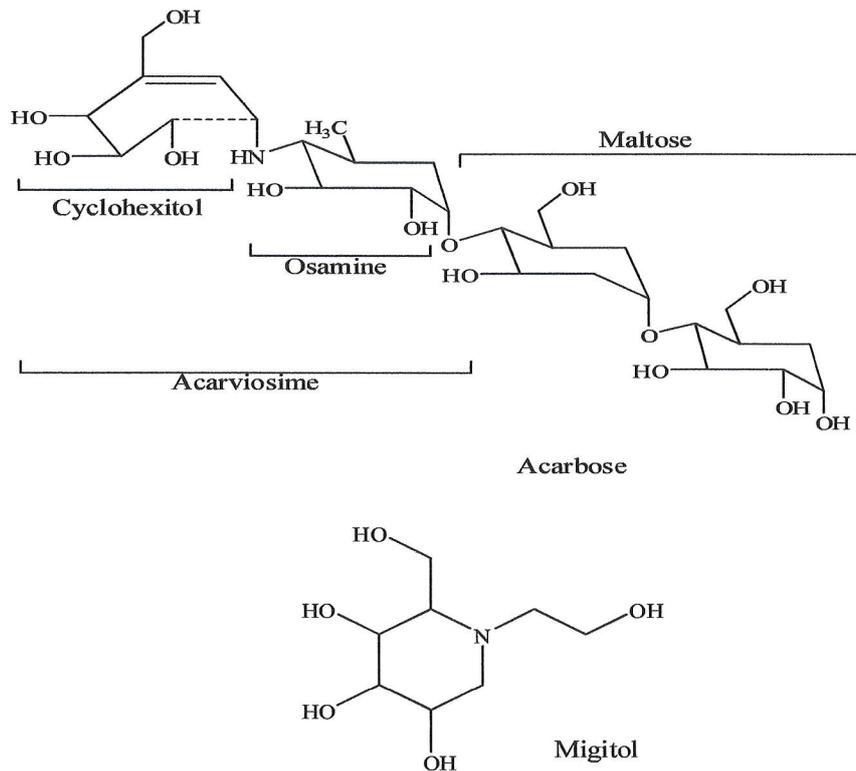


Figure 13. Les structures chimiques de deux molécules inhibitrices α -glucosidases

Mode d'action :

Les inhibiteurs des α -glucosidases agissent par l'inhibition compétitive et réversible des α -glucosidases intestinales (c'est un enzyme de la bordure en brosse des entérocytes qui hydrolyse les poly-, oligo-, et disaccharides en monosaccharides absorbables tel le glucose et le fructose) [15]. Ces inhibiteurs ralentissent le clivage enzymatique des sucres alimentaires en mono et disaccharides qui sont alors absorbés dans l'iléon, diminuent ainsi la dégradation des carbohydrates en monosaccharides absorbables et réduit les pics glycémiques, insuliniques ainsi que les triglycérides postprandial (Figure 14) [16].

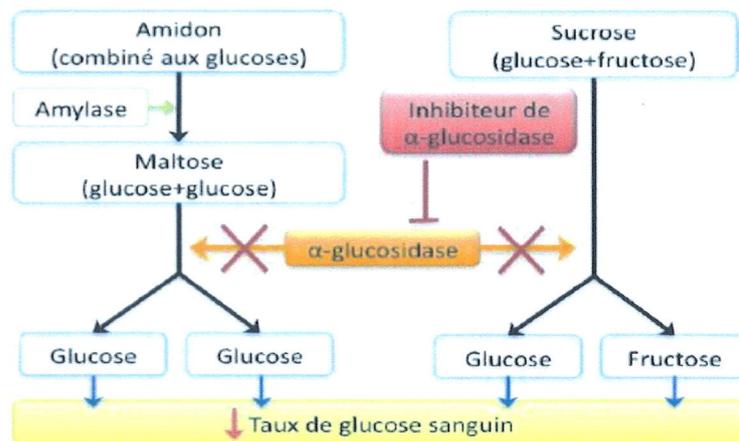


Figure 14. Mécanisme d'action des inhibiteurs α -glucosidases

III.2.2.4. Les glinides :

Parmi les glinides les plus connus se retrouvent la Repaglinide et Natéglinide [17]. Ce sont des médicaments hypoglycémiants, de très courtes durées d'action, utilisés soit seules, soit en combinaison. Ils sont différents structurellement des sulfonylurées (Figure 15) [1].

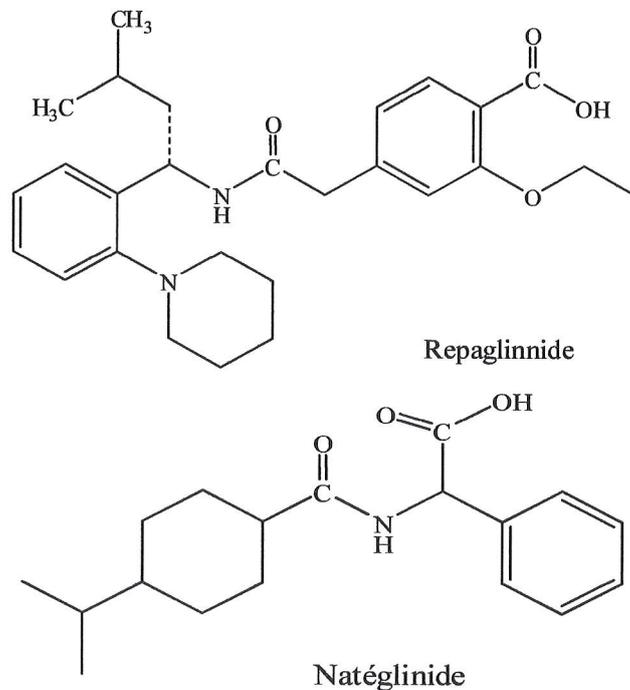


Figure 15. Les structures chimiques de deux molécules des glinides

Mode d'action :

Ce sont des sécrétagogues d'insuline qui agissent par le même mécanisme que les sulfonylurées [17], mais agissent sur le même récepteur au niveau d'un site différent (Figure 16) [1].

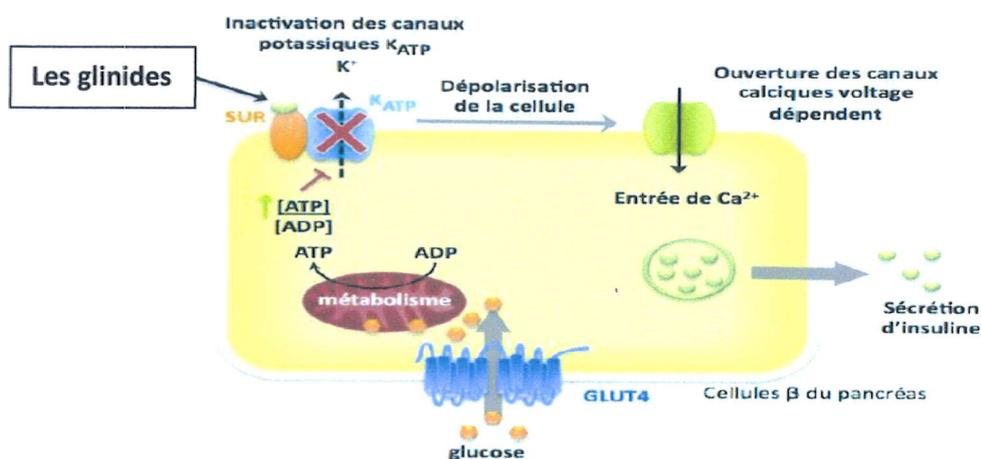


Figure 16. Mécanisme d'action des glinides



III.2.2.5. Les thiazolidinediones (les glitazones) :

Les thiazolidinediones sont les médicaments de l'insulinorésistance qui caractérise le diabète de type II. Ils agissent en améliorant la sensibilité tissulaire à l'insuline.

Ils permettent de réduire la glycémie et la glycation des protéines et de conserver la fonction sécrétoire des ilots de Langerhans.

Sont des dérivés comportant le pharmacophore thiazolidine-2,4-dione et un chaînon benzylique diversement substitué par un groupe éther. Ces dérivés sont employés sous forme racémique (Pioglitazone) ou sous forme d'énantiomère (Rosiglitazone) (Figure 17).

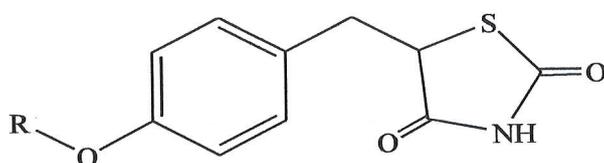


Figure 17. Le groupe pharmacophore des dérivés thiazolidinediones

Deux dérivés sont utilisés et divers composés sont en cours d'évaluation clinique (Figure 18) [13].

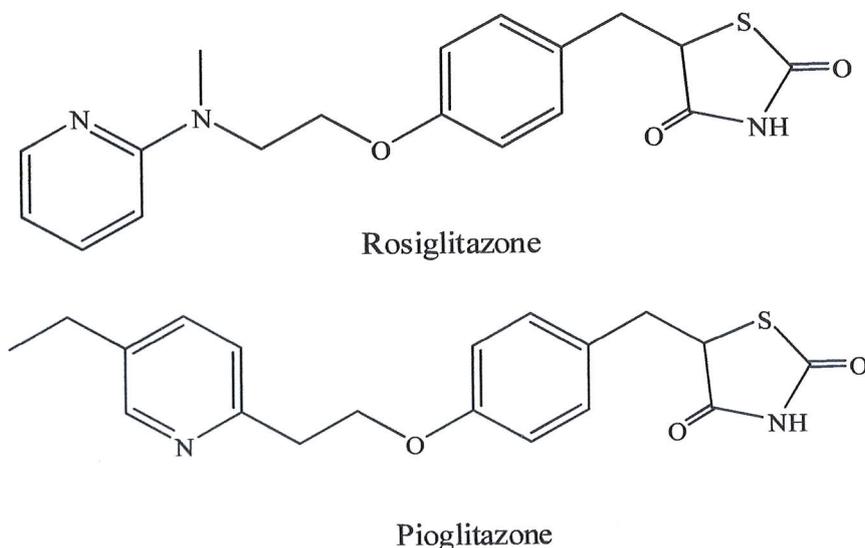


Figure 18. Les structures chimiques de deux molécules des glitazones

Mode d'action :

Ce sont des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR γ [13]. Les PPAR γ , présents sur les adipocytes, exercent une action de contrôle sur la masse grasseuse. La stimulation de ses récepteurs par les glitazones provoque la destruction des grosses cellules grasseuses

actives au plan métabolique et par conséquent, diminue les taux d'acides gras libres du sang. Améliorant ainsi indirectement la captation du glucose et son oxydation par le muscle. Réduisant au final l'insulinorésistance (Figure 19) [18].

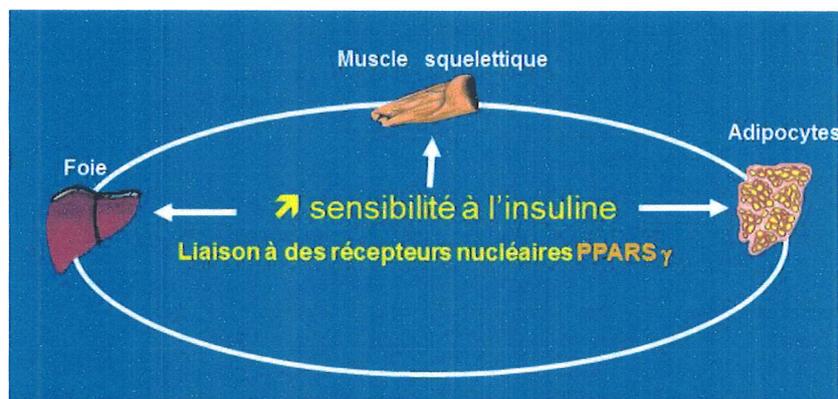


Figure 19. Mécanisme d'action des glitazones

Chapitre 2 :
Techniques de dosage
des médicaments

Chapitre 2 : Techniques de dosage des médicaments

I. La méthode de dosage par la spectrophotométrie :

I.1. Généralité :

Initialement, le terme spectroscopie se référait à une branche scientifique où la lumière était décomposée selon des différentes longueurs d'onde pour engendrer des spectres, c'est-à-dire des graphiques d'une fonction de l'intensité du rayonnement en fonction de la longueur d'onde.

Pour analyser un produit synthétisé, on dispose des techniques physiques diverses telles que la spectroscopie IR, UV-Visible et spectroscopie RMN. Ces méthodes d'étude physique des composés organiques mettent en jeu l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière. Selon le domaine d'énergie impliqué, différents transitions peuvent être excités [19].

I.2. Spectrophotométrie UV-Visible :

La spectroscopie d'absorption Ultraviolette et Visible est une méthode d'analyse quantitative. Elle est essentiellement fondée sur le phénomène d'absorption d'énergie lumineuse par une substance [20].

Le domaine UV-Visible s'étend environ de 10 à 800 nm avec l'UV lointain entre 10 et 200 nm, le proche UV entre 200 et 400 nm et le visible entre 400 et 800 nm. La spectroscopie UV-Visible présente un large domaine d'application. Elle est utilisée en chimie minérale, chimie organique, biochimie, analyses médicales et analyses quantitatives. Cette large utilisation est surtout due à sa grande sensibilité, sa précision, sa rapidité et sa simplicité d'utilisation (Figure 20) [21].

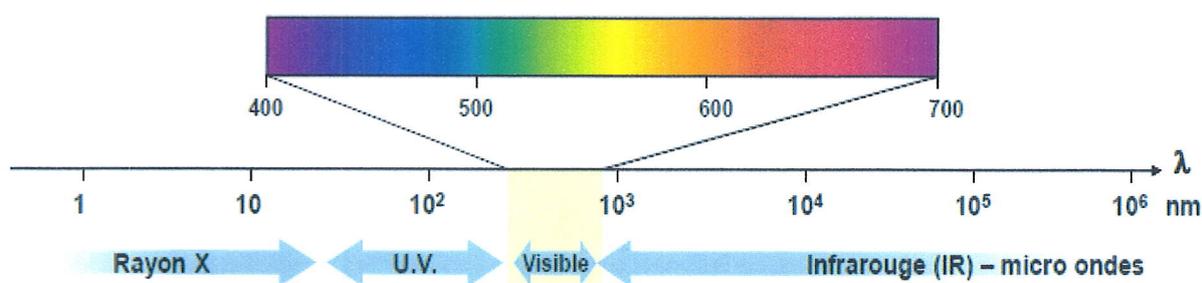


Figure 20. Spectre électromagnétique de la lumière et domaine UV-Visible

I.2.1. Principe :

Le spectrophotomètre consiste surtout à mesurer l'absorbance dans le domaine UV-visible. Cette absorption est due au passage d'un électron d'un niveau énergétique à un niveau énergétique supérieur avec une modification des états de vibration et de rotation. Ainsi, l'électron passe d'une orbitale moléculaire à un autre [20].

D'une manière générale, la solution dont on désire étudier son absorption est placée dans une cuve en quartz à faces transparentes et parallèles, et qui est traversée par un faisceau optique perpendiculairement à ces faces. Après avoir fixé une longueur d'onde, la lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse la cuve contenant la solution et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par l'appareil est l'absorbance à cette longueur d'onde (Figure 21) [22].

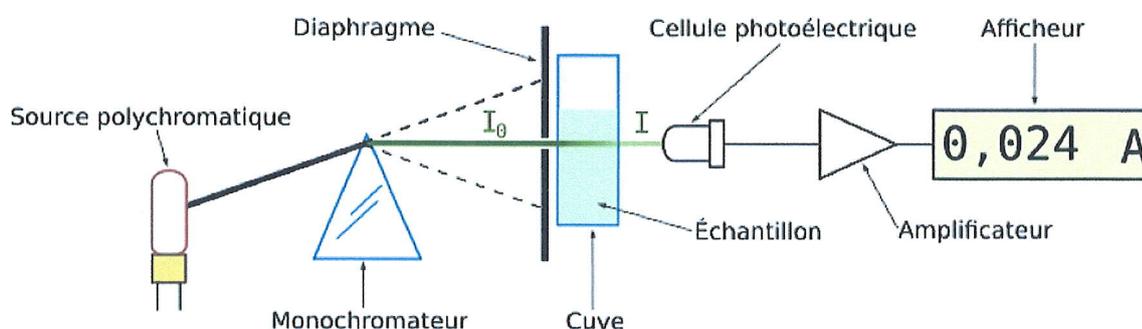


Figure 21. Principe fonctionnement de l'UV-Visible

I.2.2. Application :

L'ultraviolet est une méthode utilisée pour l'étude des équilibres en solution très diluées, le contrôle de pureté d'une substance, l'analyse quantitative (dosage). Elle sert aussi pour la détermination de la constante d'acidité, de stabilité et le dosage du produit principaux. En effet, l'absorption des composés est exploitée à l'analyse quantitative par l'application de loi de Beer-Lambert (Figure 22) [20].

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon.l.c$$

A : L'absorbance

I_0 : L'intensité lumineuse incidente

I : L'intensité lumineuse transmise par l'échantillon

ϵ : Le coefficient d'absorption molaire ($L. mol^{-1}. cm^{-1}$)

l : La largeur de la cuve (cm)

c : La concentration de la solution (mol. L^{-1})

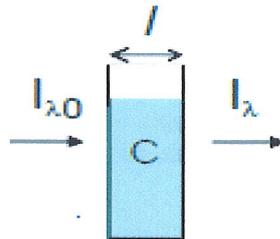


Figure 22. Principe de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire

II. La méthode de dosage par la chromatographie :

II.1. Généralité :

La chromatographie est une méthode analytique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile. Les méthodes chromatographiques peuvent être classées en fonction de la nature physique des phases (mobile et stationnaire). Les plus courantes sont la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide (CL) [23].

II.2. Chromatographie liquide à haute performance :

II.2.1.Principe :

La CLHP est une technique de séparation qui implique l'injection d'un petit volume d'échantillon liquide dans une colonne contenant de petites particules appelé phase stationnaire. Les composants de l'échantillon se déplacent dans la colonne avec la phase mobile de haut en bas par la haute pression exercée par une pompe. Ces composants sont séparés l'un de l'autre par la colonne qui implique des indications chimiques et/ou physiques diverses entre leurs molécules et les particules de remplissage.

Au niveau de détecteur, chaque composé d'un mélange sortant de la colonne est détecté donnant un signal, ce dernier est enregistré par le système de traitement des données se forme d'un pic. L'ensemble des pics forme un chromatogramme (Figure 23) [24].

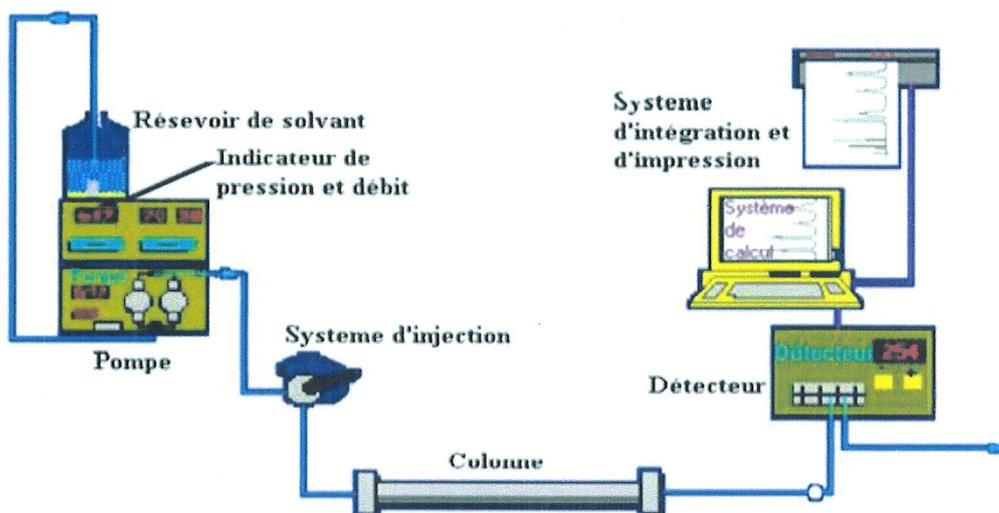


Figure 23. Principe de fonctionnement de la CLHP

II.2.2. Les domaines d'application de la CLHP :

Les domaines d'application de la CLHP sont nombreux mais elle est particulièrement employée en cosmétologie, en biochimie et en chimie analytique (environnement, pollution, etc....) et organique (produits naturels, applications pharmaceutiques, etc...). C'est une méthode «douce» permettant l'analyse ou la séparation de tous les types des substances (à grand poids moléculaire, ionisées, etc...) [23].

II.2.3. L'appareillage de la CLHP :

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique, d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (Figure 23) [25].

II.2.3.1. Le réservoir de la phase mobile :

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé [25].

II.2.3.2. La pompe :

Elle doit fournir la phase mobile à un débit constant à une certaine pression pour atteindre la colonne. Elle permet de travailler soit :

- En mode isocratique, c'est-à-dire avec 100 % d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- En mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la composition des constituants du mélange d'éluant [26].

II.2.3.3. L'injecteur :

Le type d'injecteur le plus courant consiste en une vanne à boucle d'échantillonnage. On introduit d'abord l'échantillon dans une boucle de volume connu ; après rotation de la vanne, la phase mobile entraîne l'échantillon en tête de colonne. Le volume injecté est constant, cela permet donc de travailler en étalonnage externe pour une analyse quantitative [23].

II.2.3.4. La colonne :

La colonne est l'élément majeur de la chaîne CLHP. Elle est en acier inoxydable [23]. Le choix d'une colonne CLHP est lié aux paramètres suivants :

Le type de la phase stationnaire, la longueur, diamètre des particules, débit de la phase mobile supportable [26].

La phase stationnaire est maintenue entre deux disques frittés, en distingue deux types de phase stationnaire :

✓ La phase stationnaire normale :

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête (Figure 24).

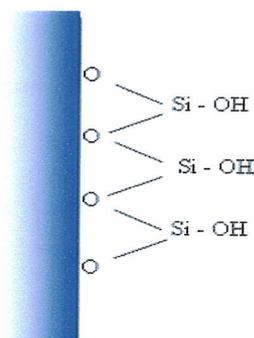


Figure 24. Structure de gel de silice

✓ **La phase stationnaire inverse :**

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 et 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire tel que l'acétonitrile, le méthanol et l'eau. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante (Figure 25) [27].

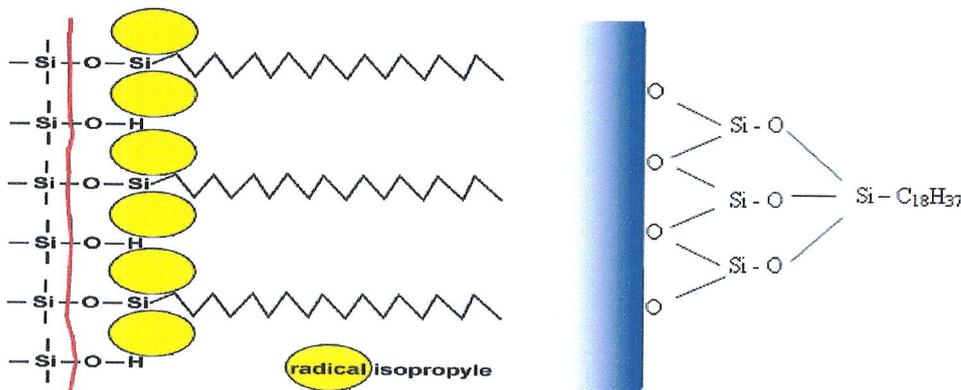


Figure 25. Structure de gel de silice greffée

II.2.3.5. Le détecteur :

Le détecteur est relié à la sortie de la colonne. Les solutés en sortie de la colonne chromatographique sont en solution très diluée dans une phase éluant dont la nature et la composition varient d'une analyse à l'autre, de ce fait un détecteur est nécessaire puis qu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés. Le choix d'un détecteur dépend aux lois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires.

Le détecteur suit l'apparition des analytes. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Il existe différents types de détecteurs [28] :

- ✓ Photomètre UV-Visible
- ✓ Détecteur réfractométrie
- ✓ Détecteur fluorimétrie

Chapitre 3 :
Critères de validation
d'une méthode
d'analyse

Chapitre 3 : Critères de validation d'une méthode d'analyse

I. Définition de validation:

La validation d'une méthode analytique est un outil de l'assurance qualité. Elle permet de vérifier la conformité d'une procédure par rapport à un référentiel [29].

La validation qui est une exigence réglementaire permet de donner aux laboratoires et aux autorités compétentes des garanties suffisantes pour que chacune de ses mesures qui seront réalisées ultérieurement en routine avec ladite méthode et seront suffisante proche de la « vrai valeur ». Ce concept de validation a donné une grande importance au développement de nouvelles méthodes analytiques dont la plus part se voient aujourd'hui normalisées [30].

II. Les critères de validation :

Les étapes de développement et de validation des méthodes d'analyses dépendent du type de procédé en cours de développement. Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyses et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont les suivants :

II.1. Le domaine de linéarité :

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnel à la qualité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon [31].

II.2. La limite de détection :

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte, dans les conditions expérimentales décrites de la procédure [31].

$$LD= 3,3\delta/S$$

Où: δ : Déviation standard de la courbe d'étalonnage

S : La pente de la droite

II.3. La limite de quantification :

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales détectées [31].

$$LQ=10\delta/S$$

II.4. La justesse :

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. La mesure de la justesse est généralement exprimée en terme de recouvrement et de biais [31].

II.5. La fidélité :

La fidélité d'une méthode correspond au degré d'accord entre les résultats des mesures obtenus par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés des conditions prescrites. La fidélité peut s'évaluer à trois niveaux : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

- **Répétabilité** : Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

- **Fidélité intermédiaire** : Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identique dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisation des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.

- **Reproductibilité** : Conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents [31].

II.6. L'exactitude :

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, en d'autres termes l'erreur totale lié au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité [32].

II.7. La spécificité :

La spécificité de la méthode d'analyse mérite une mention toute particulière, car elle renseigne sur le fait que la réponse mesurée n'est pas perturbée par des espèces physicochimiques autres que l'analyte considéré. L'application d'une méthode d'analyse spécifique n'exigera donc pas de prendre des précautions particulières si la matrice de départ et par suite le milieu de mesure ont été modifiés. Si la méthode de mesure est elle-même spécifique, il en résultera que l'étape préalable de traitement de l'échantillon sera très allégée avec, en conséquence, un gain de temps considérable est une forte diminution des causes d'erreurs [32].

II.8. La sensibilité :

La sensibilité de la méthode qui représente la pente de la droite d'étalonnage ; si la courbe d'étalonnage n'est pas une droite, la sensibilité à une concentration donnée sera définie comme la pente de la tangente à la courbe à cette concentration. Il est clair que plus la sensibilité sera élevée plus il sera facile de distinguer deux échantillons de concentration voisine. Il apparaît également qu'une augmentation de la sensibilité permettra d'obtenir des limites de détection ou de quantification plus basses [32].

II.9. La robustesse :

La robustesse de la méthode caractérise le fait qu'une légère modification des conditions expérimentales (un ou plusieurs paramètres) ne modifie que très peu la réponse mesurée [32].

Partie II :
Protocoles
expérimentaux

Partie II : Protocoles expérimentaux

I. Introduction :

Ce chapitre est consacré à la description des techniques expérimentales chromatographiques (CLHP) et spectroscopiques (UV-Visible), des solvants et produits chimiques utilisées pour la validation des deux méthodes de dosage d'un principe actif utilisé comme antidiabétique oral « Glibenclamide ».

II. Solvants et produits chimiques :

- Acétonitrile
- Méthanol
- Tampon KH_2PO_4 (0,05M)
- Tampon Na_2HPO_4
- Eau distillée et bidistillée
- Principe actif, Glibenclamide pur
- DIABENIL[®] (5mg)

III. Matériels utilisés :

Nous avons utilisé :

- Un appareil CLHP de marque Perkin Elmer.
- Un appareil spectrophotomètre UV-Visible de marque SECOMAM-UVILINE 9400.
- Un PH-mètre de marque inoLab Ph720 pour l'ajustement de PH de la phase mobile.
- Un bain à ultrasons de marque Elasonic-P70H.
- Une balance de type Pioneer-PA214.

IV. Méthodes d'analyse :

IV.1. Etude chromatographique par CLHP :

IV.1.1. Appareillage :

Le dosage de Glibenclamide a été réalisé sur un système RP-HPLC Perkin Elmer équipée d'une colonne C18 de 15 cm de longueur, 4.6 mm de diamètre interne et de 5 μ m de diamètre de particules, d'une pompe « Model Flexar LC », aux quels sont connectés à un injecteur manuel et un détecteur UV-visible « Model Photo Diode-LC200a-PDA ». Le volume de solution étalon ou de solution test injecté est 20 μ l. Toutes les analyses ont été traitées par le logiciel « Chromera » (Figure 26).



Figure 26. Appareil CLHP Perkin Elmer

IV.1.2. Recherche des conditions optimales :

Parmi les paramètres de réussite d'une méthode chromatographique de dosage :

- Le choix de la phase mobile
- Le choix de la longueur d'onde

✓ Choix de la phase mobile :

Une quantité (0,01 g) de principe actif de Glibenclamide a été dissoute dans l'acétonitrile pour obtenir une solution de 1mg/ml. 20 μ l de cette dernière a été injecté dans différentes pourcentage de la phase mobile suivante :

- Eau/Acétonitrile
- Eau/Acétonitrile/Tampon KH_2PO_4 (0,05M)
- Eau/Acétonitrile/Tampon Na_2HPO_4

- Eau/Acétonitrile/Méthanol
- Acétonitrile/Tampon KH_2PO_4 (0,05M)

Selon les chromatogrammes obtenus (Figure 27), nous avons choisis la phase mobile d'acétonitrile/tampon phosphate (0,05M) (60/40) à PH=4,2 pour effectuer la validation de la méthode car elle a donné de meilleurs résultats : pic fin et intense, temps de rétention plus raisonnable.

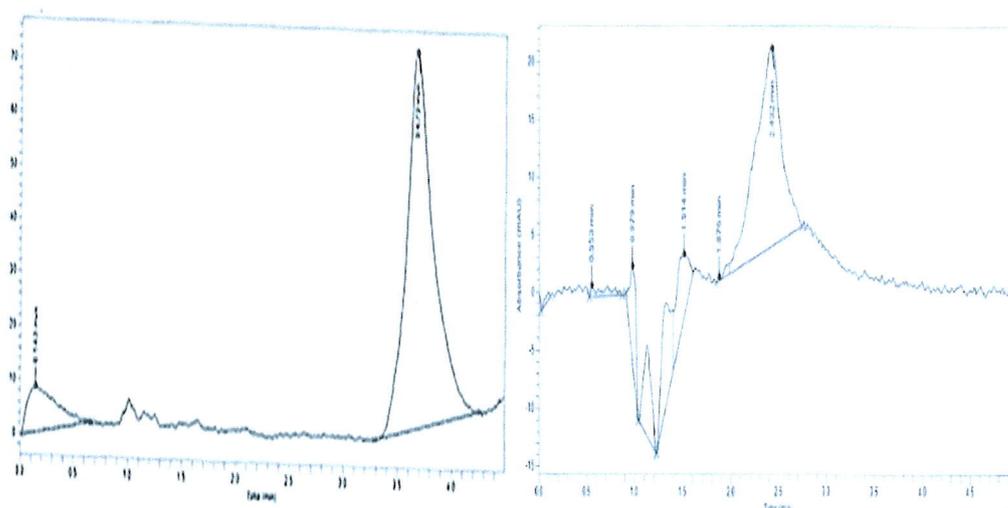


Figure 27. Quelques chromatogrammes obtenus par CLHP



✓ **Choix de la longueur d'onde d'analyse :**

Le Glibenclamide est un composé qui absorbe dans le domaine UV-Visible. L'examen des spectres UV-Visible montre que Glibenclamide contient deux longueurs d'onde maximales : 230 et 300 nm. Au cours de cette étude nous avons fixé la longueur à 230 nm.

IV.2. Etude spectrophotométrique UV-Visible :

Le Glibenclamide a été solubilisé dans l'acétonitrile, le spectre est enregistré à l'aide d'un spectrophotomètre de type SECOMAM-UVILINE 9400 dans le domaine UV-Visible allant de 200 à 800 nm. On utilise des cuves en quartz de trajet optique $l = 1$ cm. Nous avons opté pour un choix de la longueur d'onde de 300 nm vue la reproductibilité des résultats obtenus à cette longueur d'onde (Figure 28).



Figure 28. Appareil spectrophotomètre UV-Visible SECOMAM

V. Préparation des solutions :

V.1. Préparation du tampon de la phase mobile :

Le tampon phosphate d'une concentration 0,05M a été préparé comme suit : en dissolvant une masse de 3,4 g de phosphate de potassium dans 500 ml d'eau bidistillée, le PH de cette solution est 4,2.

V.2. Préparation de la solution mère :

La solution mère de principe actif « Glibenclamide » à analyser, a été préparé par la dissolution d'une quantité de 0,01g dans 10 ml de l'acétonitrile pour obtenir une concentration de 1mg/ml.

V.3. Préparation de solutions filles :

La seconde phase après la préparation de la solution mère (SM) consiste à préparer des solutions filles (SF) de concentration de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 et 200 $\mu\text{g/ml}$: on prend 10 μl de la SM et on rajoute 9990 μl d'acétonitrile pour préparer 10 ml d'une solution de concentration 1 $\mu\text{g/ml}$.

Les autres solutions filles present de la manière suivante (Figure 29) :

- SF de 5 $\mu\text{g/ml}$: 50 μl de SM + 9950 μl d'acétonitrile
- SF de 10 $\mu\text{g/ml}$: 100 μl de SM + 9900 μl d'acétonitrile
- SF de 25 $\mu\text{g/ml}$: 250 μl de SM + 9750 μl d'acétonitrile
- SF de 50 $\mu\text{g/ml}$: 500 μl de SM + 9500 μl d'acétonitrile
- SF de 75 $\mu\text{g/ml}$: 750 μl de SM + 9250 μl d'acétonitrile

- SF de 100 µg/ml : 1000 µl de SM + 9000 µl d'acétonitrile
- SF de 150 µg/ml : 1500 µl de SM + 8500 µl d'acétonitrile
- SF de 200 µg/ml : 2000 µl de SM + 8000 µl d'acétonitrile



Figure 29. Gamme d'étalon de Glibenclamide (SF)

V.4. Préparation de l'échantillon :

Nous avons travaillé sur un médicament antidiabétique de la famille des sulfamides de nom générique DIABENIL[®] (5 mg) qui contient le principe actif « Glibenclamide » ($Pk_a=5,5$) (Figure 30).

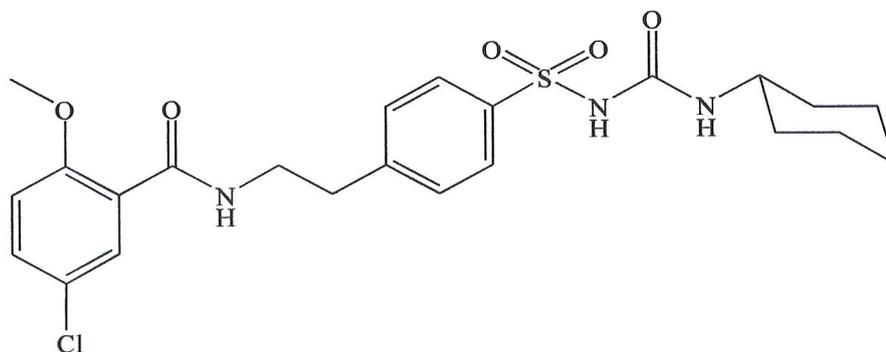


Figure 30. La formule chimique de Glibenclamide

Nous avons posé un équivalent de 10 comprimés de DIABENIL[®] et solubilisé dans une quantité de la phase mobile dans une fiole de 50 ml. Ensuite la solution a été dégazée dans un bain à ultrasons pendant 15 min, enfin elle a été filtrée et complétée à un volume de 50 ml avec la phase mobile.

VI. Procédure de la validation :

Les différents paramètres de validation à évaluer pour valider nos méthodes de dosage de Glibenclamide sont :

VI.1. La linéarité :

Nous avons préparé une solution du Glibenclamide dans l'acétonitrile avec une concentration de 1mg/ml et par dilution nous avons préparé différentes concentrations allant de 1 à 200 µg/ml. Trois mesures effectuées pour chaque concentration. La courbe d'étalonnage a été tracée avec ces concentrations à l'aide de logiciel « Prism 3.0 ».

VI.2. La fidélité :

La précision de la méthode est testée par des injections répétées de trois concentrations différentes (25, 50 et 75 µg/ml).

- **Répétabilité :**

La précision intra-jour consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans des conditions identiques.

- **Fidélité intermédiaire :**

La précision inter-jour permet d'évaluer la fidélité intermédiaire. Elle consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pendant trois jours dont le premier jour correspond à la détermination de la répétabilité.

VI.3. L'exactitude :

Pour l'évaluation de l'exactitude de la méthode de dosage de Glibenclamide, nous avons préparé dans le même jour, trois concentrations de 80, 100 et 120 µg/ml. Ces trois concentrations représentent les pourcentages 80, 100 et 120 % dans la solution de l'échantillon de Glibenclamide préparé.

VI.4. La robustesse :

La robustesse de la méthode est trouvée après la modification volontairement des paramètres :

✓ La variation de rapport de la phase mobile :

- Acétonitrile/Tampon phosphate (62/38)

- Acétonitrile/Tampon phosphate (58/42)

✓ La variation de débit :

- 0,9 min/ml

- 1,1 min/ml

✓ La variation de PH de la phase mobile :

- 4,1

- 4,3

Nous avons utilisé une solution de concentration 50 $\mu\text{g/ml}$.

Partie III :
Résultats et
discussions

Partie III : Résultats et discussions

I. Optimisation des conditions chromatographique :

L'optimisation des conditions expérimentales pour l'identification et la détermination de la quantité du Glibenclamide par l'CLHP sont :

- La phase stationnaire : C18
- La phase mobile : Acétonitrile/Tampon phosphate (0,05M ; PH= 4,2) (60/40)
- La colonne : 150×4,6 mm, 5 μ m
- Détecteur : UV
- λ_{max} = 230 nm
- Injection : 20 μ l de solution Glibenclamide
- Débit : 1 ml/min
- Mode : isocratique
- Température : Ambiante
- Tr : 3,6 min

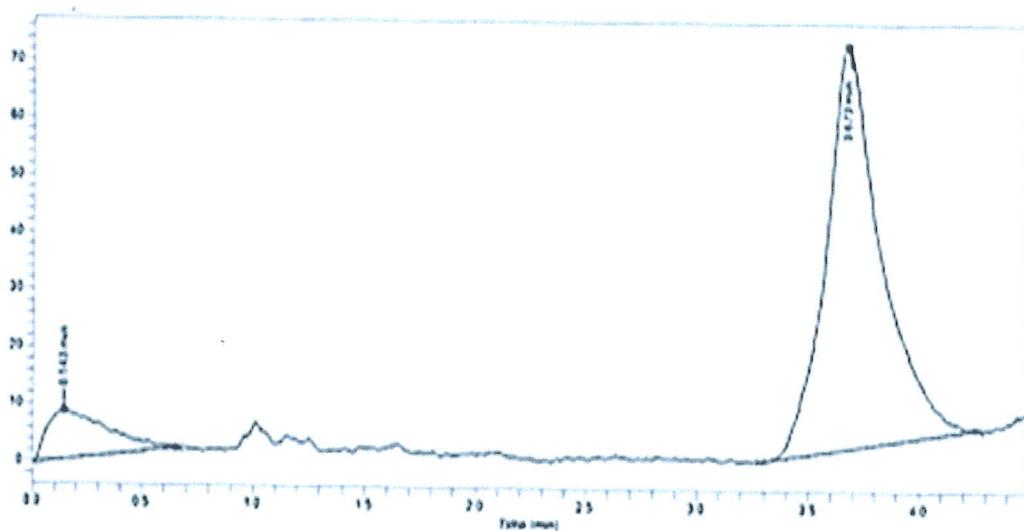


Figure 31. Chromatogramme d'acétonitrile / tampon phosphate (60/40)

II. Validation de la méthode développée :

Les deux méthodes proposées ont été validées conformément aux lignes directrices de l'International Conference on Harmonisation (ICH) pour la linéarité, la fidélité, la justesse, la limite de détection, la limite de quantification, l'exactitude et la robustesse.

II.1. La linéarité :

L'équation de la droite de régression linéaire et le coefficient de corrélation sont mentionnés sur la courbe.

II.1.1. Pour spectrophotomètre UV-Visible :

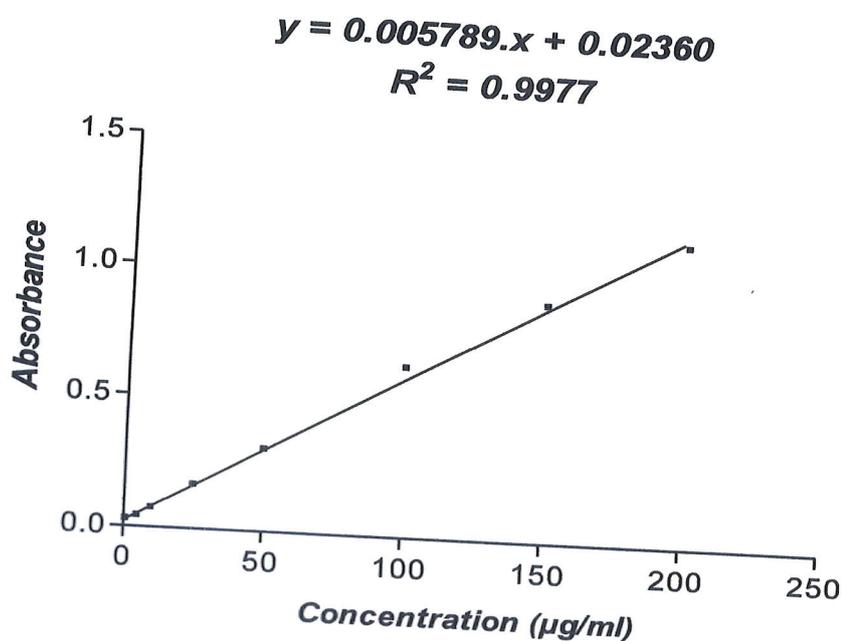


Figure 32. Courbe d'étalonnage pour le dosage de Glibenclamide par la spectrophotométrie UV

La linéarité a été vérifiée et l'équation de la courbe d'étalonnage est :

$y = 0,005789.x + 0,02360$ et le coefficient de corrélation est : $R^2 = 0,9977$ (99,77%).

Dosage de l'échantillon :

L'absorbance de la solution de l'échantillon DIABENEL[®] préparée auparavant ainsi mesurée est égale à : 0,679.

A partir de l'équation de courbe d'étalonnage : $y = 0,005789.x + 0,02360$, la concentration de l'échantillon et l'erreur sont calculés de la façon suivante :

$$0,679 = 0,005789 \cdot x + 0,02360 \quad \Rightarrow \quad x = (0,679 - 0,02360) / 0,005789 = 113,21 \mu\text{g/ml}$$

Dans 50ml : 113,21 μg \rightarrow 1ml

$$? \quad \rightarrow 50\text{ml} \quad \Rightarrow \quad x = 5,66 \text{ mg}$$

$$\text{Erreur} = ((5,66 - 5) / 5,66) \times 100 = 11,66\%$$

II.1.2. Pour chromatographie CLHP :

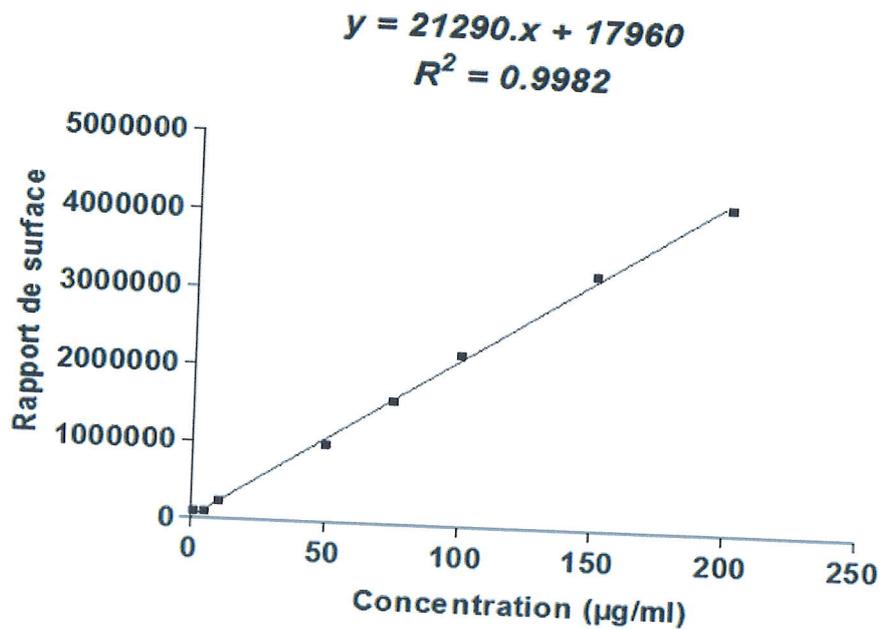


Figure 33. Courbe d'étalonnage pour le dosage de Glibenclamide par CLHP

La linéarité a été vérifiée et l'équation de la courbe d'étalonnage est :

$$y = 21290 \cdot x + 17960 \text{ et le coefficient de corrélation est : } R^2 = 0,9982 (99,82\%).$$

Dosage de l'échantillon :

Nous avons injecté la solution de l'échantillon DIABENEL[®] dans l'appareil CLHP, on obtient un pic correspond à un temps de rétention 3,6 min de surface égale à : 2277809.

A partir de l'équation de la courbe d'étalonnage : $y = 21290 \cdot x + 17960$, la concentration de l'échantillon et l'erreur sont calculés de la façon suivante :

$$2277809 = 21290 \cdot x + 17960 \quad \Rightarrow \quad x = (2277809 - 17960) / 21290 = 106,14 \mu\text{g/ml}$$

Dans 50ml : 106,14 μg \rightarrow 1ml

$$? \quad \rightarrow 50\text{ml} \quad \Rightarrow \quad x = 5,30 \text{ mg}$$

$$\text{Erreur} = ((5,3-5)/5,3) \times 100 = 5,66 \%$$

L'erreur ainsi obtenue par les deux méthodes de dosage montre que le résultat d'analyse de glibenclamide dans l'échantillon est plus précis par la CLHP.

II.2. La fidélité :

L'exploitation de ces résultats consiste à calculer la moyenne (X), l'écart-type (δ) et la déviation standard (SD), afin de calculer la déviation standard relative (%RSD) selon la formule suivante :

$$\%RSD = (SD/X) \times 100$$

II.2.1. Pour spectrophotomètre UV-Visible :

Les résultats du test de précision par l'UV-Visible sont représentés dans le tableau :

Tableau 1. Résultats du test de précision par spectrophotométrie UV-Visible

[C] A	1 ^{er} jour			2 ^{ème} jour			3 ^{ème} jour		
	25µg/ml	50µg/ml	75µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	75µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	75µg/ml
A ₁	0,137	0,317	0,443	0,137	0,321	0,451	0,143	0,321	0,452
A ₂	0,138	0,317	0,444	0,143	0,319	0,451	0,145	0,322	0,461
A ₃	0,140	0,318	0,440	0,146	0,317	0,450	0,140	0,320	0,458
A _{moy}	0,138	0,317	0,442	0,142	0,319	0,450	0,142	0,321	0,457

✓ La répétabilité :

Puisqu'on a réalisé trois mesures (N = 3) d'une solution de concentration x = 25 µg/ml, on calcule la moyenne X.

$$X = \sum x_i / N$$

A partir d'équation de courbe d'étalonnage on a trouvé que :

$$x_1 = 19,58 \mu\text{g/ml}$$

$$x_2 = 19,76 \mu\text{g/ml}$$

$$x_3 = 20,10 \mu\text{g/ml}$$

Donc :

$$\bar{X} = (19,58 + 19,76 + 22,10) / 3 = 19,81 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pour calculer l'écart-type (δ) et la déviation standard (SD) on utilise la formule suivante :

$$\delta^2 = \Sigma (x_i - \bar{X})^2 / N$$

$$\delta^2 = [(19,58-19,81)^2 + (19,76-19,81)^2 + (22,10-19,81)^2] / 3 = 0,046 \text{ } \mu\text{g}^2/\text{ml}^2$$

Donc :

$$\delta = \sqrt{\delta^2} = \sqrt{0,046} = 0,21 \text{ } \mu\text{g/ml} \quad \Rightarrow \quad \text{SD} = 0,21 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

La déviation standard relative calculé comme suite:

$$\% \text{RSD} = (\text{SD}/\bar{x}) \times 100 = (0,21 / 25) \times 100 = 0,84\%$$

De la même manière on a calculé les autres concentrations qui sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 2. Résultats du test de répétabilité par spectrophotométrie UV-Visible

Concentration	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	75 $\mu\text{g/ml}$
X	19,81	50,73	72,32
δ ou SD	0,21	0,07	0,29
%RSD	0,84	0,14	0,37

D'après ces résultats on constate que la %RSD est inférieur à 5% donc la répétabilité est bien validé.

✓ **Fidélité intermédiaire :**

Les résultats du test fidélité intermédiaire sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3. Résultats du test de fidélité intermédiaire par spectrophotométrie UV-Visible

Concentration	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	75 $\mu\text{g/ml}$
X	20,22	51,02	73,92
δ ou SD	0,32	0,26	1,03
%RSD	1,28	0,52	1,37

D'après ces résultats on constate que le % RSD appartient au domaine de référence certifiée donc la fidélité intermédiaire est bien validée.

II.2.2. Pour chromatographie CLHP :

Pour la précision de la méthode par CLHP nous avons suivi la même procédure citée ci-dessus par la spectrophotométrie UV-Visible.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 4. Résultats de la précision par CLHP

	1 ^{er} jour			2 ^{ème} jour			3 ^{ème} jour		
[C] S	25µg/ml	50µg/ml	75µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	75µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	75µg/ml
S ₁	452092	870743	1585681	485954	923743	1457581	513776	923363	1592161
S ₂	434328	898806	1506408	508601	966788	1441612	492465	921064	1579121
S ₃	455980	901813	1533284	508092	988673	1547714	511588	946181	1580255
S _{moy}	447466	890454	1541791	500882	959734	1488302	505943	930202	1557179

✓ Répétabilité :

Tableau 5. Résultats du test de répétabilité par CLHP

Concentration	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml
X	20,17	41,26	71,57
δ ou SD	0,43	0,93	1,54
%RSD	1,72	1,86	2,05

Les valeurs de la variation standard relative obtenue sont autour de 2,5 %, on considère que la répétabilité est validée.

✓ Fidélité intermédiaire :

Tableau 6. Résultats du test de fidélité intermédiaire par CLHP

Concentration	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml
X	21,92	42,68	70,97
δ ou SD	1,24	1,33	1,38
%RSD	1,76	2,66	1,84

D'après ces résultats on constate que le % RSD appartiennent au domaine de référence certifiée donc la fidélité intermédiaire est bien validée.

II.3. La justesse :

Pour apprécier la justesse, nous mesurons l'erreur relative entre les trois valeurs d'essai réalisées sur trois jours ceci aux trois concentrations différentes (25, 50 et 75 µg/ml) et la valeur de référence.

II.3.1. Pour la spectrophotométrie UV-Visible :

✓ **Intra-jour :**

Tableau 7. Résultats du test d'intra-jour par spectrophotométrie UV-Visible

Concentration	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml
δ ou SD	5,19	0,30	3,14
%RSD	20,76	0,60	4,18

✓ **Inter-jour :**

Tableau 8. Résultats du test d'inter-jour par spectrophotométrie UV-Visible

Concentration	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml
δ ou SD	5	0,72	2,15
%RSD	20,36	1,45	2,86

Les résultats du test de justesse montrent que la méthode spectrophotomètre est juste (inférieur à 5 %), mais il y a des erreurs de manipulation pour la concentration 25 µg/ml.

II.3.2. Pour la chromatographie CLHP :

✓ **Intra-jour :**

Tableau 9. Résultats du test d'intra-jour par CLHP

Concentration	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml
δ ou SD	4,84	8,78	3,76
%RSD	19,36	17,56	5,01

✓ **Inter-jour :**

Tableau 10. Résultats du test d'inter-jour par CLHP

Concentration	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml
δ ou SD	3,31	7,43	4,25
%RSD	13,24	14,86	5,66

D'après les résultats obtenus dans le test de linéarité et de fidélité montrent que la méthode chromatographique est juste, mais le test de justesse montre qu'il y a probablement des erreurs de manipulation lors de la préparation des solutions.

II.4. Limite de détection :

Pour calculer la limite de détection on applique la formule suivante :

$$LD = 3,38/S$$

II.4.1. Pour la spectrophotométrie UV-Visible :

$$LD = (3,3 \times 0,00005938) / 0,005789 = 0,03 \mu\text{g/ml}.$$

Nous pouvons conclure que $LD = 0,03 \mu\text{g/ml}$ c'est la plus faible concentration de Glibenclamide qu'il est possible de détecter par la méthode de dosage UV-Visible, mais pas nécessairement quantifiée.

II.4.2. Pour chromatographie CLHP :

$$LD = (3,3 \times 372,1) / 21290 = 0,05 \mu\text{g/ml}$$

La valeur de la limite de détection est $0,05 \mu\text{g/ml}$, c'est la plus petite concentration de Glibenclamide détectée.

II.5. Limite de quantification :

Pour calculer la limite de quantification (LQ) on applique cette formule :

$$LQ = 10\delta/S$$

II.5.1. Pour la spectrophotométrie UV-Visible :

$$LQ = (10 \times 0,00005938) / 0,005789 = 0,10 \mu\text{g/ml}$$

Nous pouvons conclure que $LQ = 0,10 \mu\text{g/ml}$ c'est la concentration minimale de Glibenclamide qui peut être quantifié la spectrophotométrie UV-Visible.

II.5.2. Pour chromatographie CLHP :

$$LQ = (10 \times 372,1) / 21290 = 0,17 \mu\text{g/ml}$$

La valeur de la limite de quantification est de $0,17 \mu\text{g/ml}$, c'est la concentration minimale de Glibenclamide peut être quantifiée par chromatographie CLHP.

II.6. L'exactitude :

Nous avons calculé à chaque concentration de l'erreur relative (ER%) \pm le taux de recouvrement (TR%) comme suite :

$$ER\% = [(C_{\text{exp}} - C_{\text{th}}) / C_{\text{exp}}] \times 100 \quad \text{et} \quad TR\% = (C_{\text{exp}} - C_{\text{th}}) \times 100$$

Une méthode est considérée exacte, lorsque la valeur 100% est incluse dans l'intervalle de confiance (IC).

II.6.1. Pour spectrophotomètre UV-Visible :

Tableau 11. Résumé des données d'exactitude par spectrophotométrie UV-Visible

C_{th}	C_{exp}	ER%	TR%
80	82	2,43	102,5
100	103,6	3,47	103,6
120	124,1	3,3	103,4
		Moyenne	103,1

L'intervalle de confiance (IC) calculé est égal à $103,1\% \pm 3,06$, qui peut être écrit sous la forme [100,04-106,16].

Le 100 % proche à l'intervalle de confiance, la méthode est donc exacte.

II.6.2. Pour chromatographique CLHP :

Tableau 12. Résumé des données d'exactitude par CLHP

C_{th}	C_{exp}	ER%	TR%
80	71,48	11,91	89,35
100	101,05	1,03	101,05
120	100,53	19,36	83,77
		Moyenne	91,39

L'intervalle de confiance calculé est égal à $91,39\% \pm 10,07$, qui peut être écrit sous la forme [81,32-101,46].

Le 100% est compris dans l'intervalle de confiance, la méthode est donc exacte, néanmoins l'intervalle est large.

II.7. La robustesse :

Chaque valeur moyenne obtenue est comparé à la valeur moyenne obtenue dans les conditions optimales, ces résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 13. Résumé des résultats du test de robustesse par CLHP

Paramètre	Variation	Surface	% déviation
Standard	-----	1163880	-----
Phase mobile (ACN/Tampon KH ₂ PO ₄)	62/38	1067036	8,32
	58/42	1247586	6,7
Debit	0,9	919208	21,02
	1,1	1185861	1,85
PH de phase mobile	4,1	1254269	7,2
	4,3	1233415	5,63

La méthode CLHP ainsi développée est considérée plus au moins robuste dans la limite des conditions de travail dans le laboratoire.

*Conclusion
générale*

Conclusion générale

En se basant sur les différents critères de validation des méthodes analytiques décrits dans la littérature, ce travail tente de développer et à optimiser deux techniques de dosage d'un principe actif (Glibenclamide) dans une forme pharmaceutique solide de la famille des antidiabétiques oraux.

Au cours de notre travail, nous avons présenté une recherche bibliographique sur la pharmacologie du diabète, les techniques de dosage des antidiabétiques oraux et les différents critères de validation des techniques de dosage.

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire s'articule autour de deux étapes consécutives. La première étape décrit le développement et l'optimisation des conditions de dosage de Glibenclamide par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et par la spectrophotométrie UV-Visible. La deuxième étape consiste à valider les critères de dosage par ces deux méthodes d'analyse.

Les résultats obtenus montrent une bonne linéarité des deux méthodes ($R^2 = 0,9977$ pour la spectrophotométrie UV-Visible et $R^2 = 0,9982$ pour le CLHP) sur un domaine de concentration allant de 1 à 200 $\mu\text{g/ml}$.

L'évaluation statistique des deux méthodes proposées a révélé que toutes les valeurs des différents paramètres mesurés se situent dans les limites de validation.

Les deux méthodes proposées sont simples, rapides, sensibles, exactes, précises et spécifiques. Le temps d'analyse en chromatographique de 4.5 min permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons en un peu de temps. Par conséquent, ils peuvent être adaptés pour l'analyse de routine de Glibenclamide sous des formes pharmaceutique solide.

*Références
bibliographiques*

- [17] M. Ouchfoum, Validation des effets antidiabétiques de *Rhododendron greonlandicu* ; une plante médicinale des Grise la Baie James dans le modèle in-vitro et in-vivo : élucidation des mécanismes d'action : identification des composés actifs, 2010, p36-37.
- [18] J. Vanderstracter, Les antidiabétiques à l'aube du XXI^e siècle, 2010, p67-68.
- [19] C. Buess-Herman, J. Douchot-Weymeers et Dumont, Chimie analytique, 7^{ème} édition, 1997, p497.
- [20] P. Galez, F. Poulet et A. Brondex, Techniques spectroscopiques d'analyse, 2011, p1-17.
- [21] F. Guedira, Support de cours de spectroscopie ultra-violette, 2009, p1-3.
- [22] J. Ludovic, De la substance à la structure : Exemples en chimie organique, 2006, p16-17.
- [23] Z. Kabouche, Chimie, pharmacie, biologie, agro-alimentaire (LMD) : Cours et chromatographie, édition Dar El-Fadjr, 2007, p63-67.
- [24] R. Rosset, M. Cande et A. Jardy, Chromatographie en phase liquide et supercritique, Masson. Paris, 1991.
- [25] J. Dgroeve et F. Berthou, Méthodes chromatographiques, 2^{ème} édition, 1986, p392.
- [26] Th. Briere, Département de chimie, université de la Réunion, 2001, p36-46.
- [27] A. Coursimanlt, S.T.P Pharma Pratique, 2^{ème} édition, 1998, p478-488.
- [28] C. et A. Jardy, Chromatographie en phase liquide : Théorie des méthodes de séparation, 4^{ème} édition, 2004, p12.
- [29] S. Derraji, M. El M'Rabet, A. Dahchour, Y. Cherrah et A. Bouklouze, Validation d'une méthode de dosage du Diclofénac Sodique par UV-visible : Application à la décontamination de ce principe actif par des adsorbants naturels, *J.Mater.Environ.Sci* 6(3), 2015, p818-825.
- [30] M. Feinberg, La validation des méthodes d'analyse : Une approche chimioetrique de l'assurance qualité au laboratoire, 1996, p28-29.
- [31] Ph. Hubert, Validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches, rapport d'une commission SFSTP ; *S.T.P. Pharma Pratique* 13(3), 2003, p117-118.

Références

- [01] A.B.Andaloussi, étude des propriétés antidiabétiques de *NigillaSativa* : sites d'action cellulaires et moléculaires, 2009, p5-29.
- [02] M. Hirst, Atlas du diabète de la FID, 6^{ème} édition, 2013, p27.
- [03] J. Paul, Hormone et grandes fonctions, tom 2, 1993, p178-190.
- [04] D. Genils, Les diabètes, édition man go pratique, 2002.
- [05] DJ. Porte et RS. Sherwin, Ellerberg and rifkin's mellitus, 1997.
- [06] JC. Hutton, Insulin secretory granule biogenesis, Diabetologia, 1994, p48-56.
- [07] TD. Plant et JC. Henquin, Phentolamine and yohimbin inhibit ATP_sensitive K⁺ channels in mouse pancreatic beta-celuls, 1990.
- [08] A. Coulomb, S. Halimi et I. Chaskilevitch, Le livre blanc de diabète: sept propositions pour faire face à l'épidémie silencieuse du 21 siècle, p18.
- [09] S. Mimmouni-Zerguini, Le diabète sucré, p8-41.
- [10] A. Langlois, Optimisation de la revascularisation des ilots pancréatiques au cours de la transplantation : approche génétique ou pharmacologique, 2008, p35.
- [11] S. Derfoufi, B. Meddah, Y.Ramli et Y.Cherrah, Actualités dans le traitement médicamenteux du diabète de type 2, 2010, p17-19.
- [12] J. Marie- kaiser, Traitement du diabète de type 2 : place de nouveaux antidiabétiques oraux, Dossier du CNHIM, tom 12(3), 2001, p14.
- [13] S. Kirkiachairia, Guide de chimie médicinal et médicaments, éditions médicales internationales, p127-129.
- [14] Ph. Passa, Les diabètes sucrés (I) : Rôle des pharmaciens d'officine et des biologistes dans les dépistages et le suivi biologique des traitements, 2002, p3.
- [15] H. Long, Les antidiabétiques oraux, La famille s'agrandi, 2003, p98-99.
- [16] Groupe d'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, Traitement médicamenteux du diabète type 2 (DNID), 1999, p30-31.

Résumé

Deux méthodes simples, sélectives, linéaires, précises et exactes ont été développées et validées pour le dosage rapide de glibenclamide sous forme de comprimés. La première est une méthode RP-HPLC (150x4.6mm, 5 µm taille des particules) en élution isocratique à un débit de 1,0 ml / min à température ambiante. La phase mobile était constituée d'acétonitrile/tampon phosphate (0,05M) (60/40) à PH=4,2. La longueur d'onde de détection UV était de 230 nm et l'échantillon a été injecté à 20 µl. Le temps de rétention pour glibenclamide a été de 3,6 min. La deuxième méthode est la spectrophotométrie UV-Visible à 300nm. Le pourcentage RSD pour la précision et l'exactitude des deux méthodes a été jugée inférieure à 5. Ces deux méthodes ont été validées conformément aux lignes directrices de l'ICH et ils ont été appliqués avec succès pour l'analyse de routine de glibenclamide sous forme de comprimés.

Mots clés : Glibenclamide, validation, CLHP, UV-visible.

Abstract

Two simple methods, selective, linear and accurate have been developed and validated for the rapid determination of glibenclamide in tablet form. The first is a RP-HPLC method (150x4.6mm, 5 µm particle size) using isocratic elution at a flow rate of 1.0 ml / min at room temperature. The mobile phase was acetonitrile / phosphate buffer (0.05M) (60/40) to PH = 4.2. UV detection wavelength was 230 nm and the sample was injected at 20 µl. The retention time for glibenclamide was 3.6 min. The second method is the UV-visible spectrophotometry at 300 nm. The percent RSD for the precision and accuracy of the two methods was found to be less than 5. These two methods have been validated according to the ICH guidelines and have been successfully applied for routine analysis of glibenclamide in tablets.

Keywords: Glibenclamide, validation, HPLC, UV-visible.

ملخص

وضعت طريقتين بسيطتين ، انتقائيتين، خطيتين ودقيقتين وقد تم التحقق من صحتها من اجل التحديد السريع لغليبينكلاميد في شكل اقراص. الأولى هي طريقة RP-HPLC (150x4.6 mm ، 5µm حجم الجسيمات) باستخدام شطف تام بمعدل تدفق 1.0 ml / min في درجة حرارة الغرفة. وكانت المرحلة المحمولة مكونة من الأستونتريل / العازلة الفوسفات (0.05M) (40/60) عند PH = 4.2 و كان الطول الموجي بواسطة كشف بالأشعة فوق البنفسجية 230 nm و تم حقن عينة 20 µl. وقت الاحتفاظ للغليبينكلاميد كان 3.6 min. الطريقة الثانية هي القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية مرئية في 300 nm. تم العثور على نسبة RSD المنوية أقل من 5 من اجل صحة ودقة طريقتين. هاتين الطريقتين وفقا ل ICH تم تطبيقهما بنجاح لتحليل الروتيني للغليبينكلاميد في الأقراص.

كلمات البحث: غليبينكلاميد ، المصادقة، RP-HPLC ، الأشعة فوق البنفسجية مرئية .

