République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Chimie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Chimie

Option : *Chimie Physique*

Intitulé : *Méthodes Physiques d'Analyse*

Présenté par

Meriem KEMEL

THEME

Apport des méthodes chromatographiques dans l'analyse de la dexchlorphéniramine dans la matière première, le produit fini et le plasma

Soutenu publiquement le 20/06/2012 devant le Jury composé de :

Mr. S. Khelili	**Professeur à l'Université de JIJEL**	**Président**
Mr. M H. Guermouche	**Professeur à l'USTHB**	**Rapporteur**
Mr. S. SEBIH	**Professeur à l'USTHB**	**Examinateur**
Mr. M. BELGHOBSI	**MCA à l'Université de JIJEL**	**Examinateur**

2011-2012

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la patience et le courage de terminer ce travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chromatographie de la faculté de chimie à l'U.S.T.H.B, dirigé par le Professeur ***M.H. GUERMOUCHE*** *que je remercie pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et conseillé dans mon travail.*
Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance pour l'honneur et la confiance qu'il a placée en moi. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements.

Je tiens à exprimer toutes mes remerciements à Madame ***S. GUERMOUCHE****, Professeur à l'U.S.T.H.B, pour sa gentillesse et pour l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ce travail. Son intérêt, son suivi de mes travaux et ses précieux conseils m'ont été d'un grand profit. Je la remercie infiniment.*

Ma gratitude et mes plus vifs remerciements vont également à Monsieur ***S. SEBIH*** *Professeur à l'U.S.T.H.B, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.*

Mes remerciements vont également à Monsieur ***M. BELGHOBSI*** MCA à *l'Université de JIJEL pour l'honneur qu'il ma fait d'avoir accepté de faire partie de ce jury.*

Je prie Monsieur ***S. KHELILI****, Professeur à l'Université de Jijel, d'accepter mes plus vifs remerciements, en me faisant l'honneur de présider le jury de thèse.*

Que tous les membres du laboratoire soient remerciés pour l'ambiance de travail agréable qu'ils ont su créer tout au long de ces années.

A ma mère,

A mon père,

A mes sœurs, mes frères,

A tous mes amis(es)

SOMMAIRE

Introduction générale ……. 1

Chapitre I : Généralités

I-1 Généralités sur les médicaments …… 3

I-1-1 Définitions …… 3

I-1-1-1 Le principe actif …… 3

I-1-1-2 Les excipients …… 3

I-1-2 Les antihistaminiques …… 4

I-1-3 Propriétés physico-chimiques du maléate de dexchlorphéniramine …… 4

I-1-4 La pharmacocinétique du maléate de dexchlorphéniramine ……7

I-1-4-1 Absorption …… 7

I-1-4-2 Distribution …… 7

I-1-4-3 Métabolisme ……7

I-1-4-4 Elimination …… 8

Chapitre II
Différentes Étapes du contrôle d'un médicament

II-1 Contrôle qualité du principe actif …… 9

II-1-1 Identification …… 10

II-1-2 Essais …… 10

II-1-2-1 Substances apparentées …… 10

II-1-2-2 Métaux lourds …… 10

II-1-2-3 Solvants résiduels …… 10

II-1-3 Dosage …… 10

II-2 Validation d'une méthode d'analyse de médicament …… 11

II-2-1 Objectif …… 12

II-2-2 Définition d'une validation analytique …… 12

II-2-3 Critères de validation …… 12

II-2-3-1 Spécificité ……..……..……..... 13
II-2-3-2 Linéarité ……..……...……...…… 13
II-2-3-3 Fidélité ……..……..... 13
II-2-3-4 Exactitude …….…..... 14
II-2-3-5 Robustesse ……...……..……..……...…..……. 14
II-2-3-6 Limite de détection ……..……...…….……..…... 14
II-2-3-7 Limite de quantification ……...……..……..……..……...…. 15
II-2-3-8 Stabilité ……...…..….…. 15

Chapitre III

Techniques Utilisées pour le Dosage

III-1 Les Méthodes Chromatographiques ……..……..…..…….…….. 16
III-1-1 La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) ..…….…….…….. 16
III-1-2 La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) ...…….....……..…….……. 17
- Le FID (Détecteur à Ionisation de Flamme) ….....……..……...…..……..……..….. 18
III-1-3 La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM) ……..... 18
III-1-3-1 Définition ……..……...……..... 19
III-1-3-2 Principe général de fonctionnement d'un spectromètre de masse …..……..… 19
III-1-4 Grandeurs utilisées en chromatographie ……....……....……..……...… 18
- Facteur de capacité ……..……...…..…….... 18
- Sélectivité ……..……..……..…..…….. 20
- Efficacité ……...…..…..…..……..……..……..... 20
- Résolution ……...……...……...……...…..... 21
- Facteur de symétrie ……...…..….….... 21

III-2 Les Méthodes de Purification ….……...……..... 21

Chapitre IV

MATERIEL & METHODES

IV.1 <u>Partie I</u> : Détermination de la pureté énantiomérique, recherche des impuretés et dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans la matière première selon la pharmacopée

IV-1-1 Identification ……...……...……...……...…..… 25

IV-1-1-1 Pouvoir rotatoire spécifique …….....……..……..……..…..... 25

IV-1-1-2 Spectroscopie infrarouge …...……...……..……..……..... 25

IV-1-1-3 Test des Chlorures ……..…...……..……...……..……...…..... 25

IV-1-2 Essai ……...……..……..……...……...……..… 26

IV-1-3-1 Substances apparentées …..……..…….....……..… 26

IV-1-3-2 Pureté énantiomérique …..……..……..... 27

IV-1-3-3 Métaux lourds ……..……..……..…..……....…. 27

IV-1-3-4 Cendres sulfuriques ……...…. 28

IV-1-3-5 Perte à la dessiccation ……..……..... 28

IV-1-3 Dosage ……...……..…..……..……. 28

IV-2 <u>Partie</u> II : dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans le comprimé .....…….. 29

IV-2-1 Étude de la biodisponibilité in vitro (test de dissolution) ……..……... 29

IV-2-2 Validation de la méthode de dosage de dexchlorphéniramine dans le comprimé ….. 31

IV-2-2-1 Mise au point de la méthode et optimalisation des conditions …….…..……..... 31

IV-2-2-2 Validation de la méthode ……..……....…...……..…….…..... 32

IV-2-2-2 -1 Spécificité (1) ……..……..... 33

IV-2-2-2 -2 Linéarité …...……...……..…..……..… 33

IV-2-2-2 -3 Spécificité (2) ……..……...……..... 33

IV-2-2-2-4 Fidélité …...……..……..……....……..…….....……..... 34

IV-2-2-2-5 Exactitude ……..……..…...……...……..……....…… 35

IV-2-2-2-6 Limite de détection & Limite de quantification ……..…….....…..……... 35

IV-2-2-2-7 Robustesse ……...……..……...……...……...……..... 35

IV-2-2-2-8 Stabilité ……..……..……..……..... 35

IV-3 <u>Partie III</u> : dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans le plasma ……..… 36

IV-3-1 Evolution de la biodisponibilité in vivo ……..……..……..……..…… 36

IV-3-2 Extraction des échantillons ……...……..……...… 37

Chapitre V

RESULTATS & DISCUSSION

V.1 <u>Partie I</u> : Détermination de la pureté énantiomérique, recherche des impuretés et dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans la matière première selon la pharmacopée

V-1-1/ Identification ……..……..……..…….. 38

V-1-1-1 Pouvoir rotatoire spécifique …..……..…..…….. 38

V-1-1-2 Spectroscopie IR ……..…….....……....….... 39

V-1-1-3 Test des Chlorures …..……..……..……..……....….... 40

V-1-2/ Essai …….……..….…….……..... 40

V-1-2-1 Substances apparentées …….…..…….....……..…. 41

V-1-2-2 Pureté énantiomérique ……...……..……..……...…..… 42

V-1-2-3 Perte à la dessiccation ……..……..…… 43

V-1-2-4 Métaux lourds ……..……...…….....…. 43

V-1-2-5 Cendres sulfuriques ……..……...……..…… 44

V-1-3/ Dosage ……..……..…..……..……...…..… 44

V.2 <u>Partie II</u> : dosage de la dexchlorphéniramine dans le comprimé ……..…..... 47

V-2-1 Étude de la biodisponibilité in vitro ……...……...… 47

V-2-2 Validation de la méthode de dosage de dexchlorphéniramine dans le comprimé 47

V-2-2-1 Mise au point de la méthode et optimalisation des conditions ..……...…..... 50

- Recherche des conditions chromatographiques optimales d'analyse ……..…….. 50
  - Facteur de capacité ……..……... 50
  - Nombre de plateaux théorique ……..…..…….. 51
  - Facteur de trainé ……...……..…...……..... 52

V-2-2-2 validation de la méthode analytique ……..…..……..…….……... 54

V-2-2-2-1 Spécificité (1) …….…….……...…..…..…..……... 54

V-2-2-2-2 Linéarité ……..…….…….…..…..……... 54

a)- Détermination de la droite de régression et calcul de ses paramètres ……..... 55

b)- Calcul du biais …….…....…...…….…..... 56

V-2-2-2-3 Spécificité (2) …….…..…..…...……..... 58

V-2-2-2-4 Fidélité …….……...…….…..... 58

V-2-2-2-5 Exactitude ……..…..……..... 60
V-2-2-2-6 Limite de détection & Limite de quantification ……...……..... 62
V-2-2-2-7 Robustesse ……...…….……..……..…. 62
V-2-2-2-7-1 Variation du pH ……..……..... 62
V-2-2-2-7-2 Variation du débit ……..……...……..... 63
V-2-2-2-7-3 Variation de la longueur d'onde ……..…….……..... 64
V-2-2-2-8 Stabilité ……..…….……..... 65

V-3 <u>Partie III</u> : Dosage de la dexchlorphéniramine dans le Plasma …….……...……... 67

V-3-1 Choix de l'étalon interne ……....…..……....…….….... 67
V-3-2 Analyse chromatographique des extraits plasmatiques ……....…..…….. 67
V-3-3 Evolution de la biodisponibilité in vivo …….…..……..……....….……...…. 71

Conclusion générale ……....…..…..……...…….…. 73

Références Bibliographiques ……....……..…….…….…….…. 75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : *Propriétés physico-chimiques du maléate de DCP* …….....……..... 5

Tableau 2 : *Structures des métabolites de la Chlorphéniramine* ……....……....……. 8

Tableau 3 : *Conditions chromatographiques utilisées* …..……..……..... 26

Tableau 4 : *Protocole du test de dissolution* ……...…….…..…. 29

Tableau 5 : *Conditions chromatographiques utilisées* …….……. 30

Tableau 6 : *Pourcentage d'ACN dans les phases mobiles étudiées* ……...……..... 32

Tableau 7 : *Préparation des solutions pour la linéarité* ……...……...….. 33

Tableau 8 : *Préparation des solutions pour la spécificité* …….…….…..…. 34

Tableau 9 : *Résultats du contrôle physicochimique du maléate de DCP*……...…… 46

Tableau 10 : *Surfaces des pics de DCP et de son étalon interne obtenues* ……...…....…. 47

Tableau 11: *Concentrations de la DCP libérées dans le milieu de dissolution*……..……...……. 49

Tableau 12 : *Pourcentage des concentrations de DCP libérées dans le milieu* …….….…….. 49

Tableau 13 : *Résultats de test de conformité* ……..……..….. 53

Tableau 14 : *Paramètres de la courbe d'étalonnage* …….…….…..……..... 56

Tableau 15 : *Résultats de l'étude de la linéarité*……...…….…… 57

Tableau 16 : *Résultats de l'étude de la fidélité* ……...……...….. 59

Tableau 17 : *Pourcentage des concentrations calculées* …..…….....… 59

Tableau 18 : *Variations intra-jour et inter-jour de la fidélité* …...…..……...…… 60

Tableau 19 : *Résultats d'étude de l'exactitude de DCP* …...…….....…… 61

Tableau 20 : *Ecart type et moyenne des résultats* ...……...…..……...…… 61

Tableau 21 : *Variation du pH* ……... 62

Tableau 22 : *Variation du débit* ……...…….…….……... 63

Tableau 23 : *Variation de la longueur d'onde* ……...……. 64

Tableau 24 : *Stabilité des solutions préparées* ……..…….…… 66

LISTE DES FIGURES

Figure 1. *Equilibre acido-basique de la dexchlorphéniramine* …….…..…….…..... 6

Figure 2. *Structures chimiques des impuretés du maléate de dexchlorphéniramine* …….7

Figure 3. *Schéma d'un chromatographe en phase liquide* ……...……..….……. 17

Figure 4. *Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse* ….……...……...…. 17

Figure 5. *Représentation schématique de la flamme du détecteur* ……..... 18

Figure 6. *Représentation simplifiée d'un Spectromètre de Masse* ….……...……..……. 19

Figure 7. *Principe de l'extraction liquide-liquide (LLE)*…..... 22

Figure 8.*Spectres IR du maléate de dexchlorphéniramine SCR et de sa matière première* 39

Figure 9. *Chromatogramme de dexchlorphéniramine et de ses impuretés* …...……....……..… 41

Figure 10.*Chromatogramme de l'impureté énantiomérique du maléate de dexchlorphéniramine* ……..…….. 42

Figure 11. *Courbes typiques de titrage potentiométrique et de sa dérivée du maléate de DCP* ……..... 45

Figure 12. *Profils Chromatographiques obtenus du test de dissolution* …….…….. 48

Figure 13. *Histogrammes de l'influence du pH et du% d'ACN sur la rétention du pic*…..... 51

Figure 14. *Histogrammes de l'influence du pH et du % d'ACN sur le Nombre de plateaux théoriques*……..……...…….... 52

Figure 15. *Histogrammes de l'influence du pH et du % d'ACN sur la trainée du pic*……..…... 52

Figure 16. *Chromatogramme obtenu aux conditions choisies* ……..……..... 53

Figure 17. *Chromatogramme obtenu avec le placebo*……..... 54

Figure 18. *Courbe d'étalonnage* ……...……...…..……....…. 55

Figure 19. *Spécificité de la méthode de dosage de DCP*……...……...… 58

Figure 20. *Chromatogrammes de variation du pH* …..……...……. 63

Figure 21. *Chromatogrammes de variation du débit* ……..... 64

Figure 22. *Chromatogrammes de variation de la longueur d'onde*….……..……. 65

Figure 23. *Profils chromatographiques représentatifs des extraits plasmatiques*……...…...… 68

Figure 24. *Spectre de masse obtenu après fragmentation du 1er composé* ……..…..……. 69

Figure 25. *Spectre de masse obtenu après fragmentation du 2ème composé* …….…….....…. 69

Figure 26. *Les principaux ions du spectre de masse du 1er composé* ……..…… 70

Figure 27. *Spectre de masse de référence de la dexchlorphéniramine* …...…….…….. 70

Figure 28. *Evolution des concentrations plasmatiques de DCP en fonction du temps* …..…...…71

ABREVIATIONS

Les abréviations utilisées au cours de ce travail et reconnues par la communauté scientifique sont répertoriées ci-dessous :

ADME	Absorption Distribution Métabolisme Elimination
ACN	Acétonitrile
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
Antti-H_1	Antagoniste des récepteurs H_1 de l'histamine
CARBOWAX	Polyéthylèneglycol (PEG)
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CP	Chlorphéniramine
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPG/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
CPNO	Chlorphéniramine N-Oxyde
Cp	Comprimé
CSP	Code de la Santé Publique
CV	Coefficient de variation
DB5	Copolymère de diphényle (5%) diméthylpolysiloxane (95%)
DCI	Dénomination Commune Internationale
DCM	Dexchlorphéniramine maléate
DCP	Dexchlorphéniramine
DDCP	Disdesmethyl-chlorphéniramine
EI	Etalon Interne
FT-IR	Infra Rouge à Transformée de Fourier
HEPT	Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation

LLE	Liquid-Liquid Extraction
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
LI	Limite Inférieure
LS	Limite Supérieure
MP	Matière Première
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OV17	Copolymère de diphényle (50%) diméthylpolysiloxane (50%)
PA	Principe Actif
PDA	Photodiode Array Detector
ppm	partie par million
PR	Pourcentage de Récupération
Ph Eur	Pharmacopée Européenne
Qsp	Quantité suffisante pour
RSD_{inter}	Relative Standard deviation inter-day
RSD_{intra}	Relative Standard deviation intra-day
RSD_{totale}	Erreur systématique totale
SCR	Substance Chemical Reference
SD	Standard deviation (Ecart type)
SM	Solution mère
SST	System Suitability Test
T_f	Tailing Factor
Br. Ph	British Pharmacopeia
JP	Pharmacopée Japonaise
USP	United States Pharmacopeia

Introduction

Générale

Les méthodes séparatives occupent une place privilégiée dans l'analyse des médicaments. Ainsi dans l'analyse qualitative, la chromatographie sur couche mince est systématiquement utilisée dans le contrôle de la matière première.

Dans le domaine de l'analyse des produits pharmaceutiques (matières premières et produits finis) la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est un outil indispensable. Seulement, dans les années quatre-vingts, la CPG a perdu de son importance dans ce domaine avec l'introduction de la chromatographie en phase liquide (HPLC). Plus de quatre-vingt dix pour cent de l'analyse des principes actifs dans le produit fini sont menés par HPLC.

La CPG reste néanmoins un outil utilisé dans l'analyse des rares principes actifs volatils, la pharmacopée en expose quelques uns, citons : acide valproique, dexchlorphéniramine et certains barbituriques. Couplée à la spectrométrie de masse, la CPG est un outil analytique puissant par sa sélectivité et sensibilité.

Le maléate de dexchlorphéniramine a été sélectionné comme molécule modèle. Il est important de signaler que ce choix a été fait en raison de l'importance analytique que pose cette substance médicamenteuse.

Le maléate de chlorphéniramine fait partie du groupe des antihistaminiques. La dexchlorphéniramine maléate est l'isomère dextrogyre (la forme d) du maléate de chlorphéniramine. La chlorphéniramine maléate est un mélange racémique dont seule la forme d est active. C'est pourquoi la dose de chlorphéniramine maléate utilisée sera doublée par rapport à celle de la dexchlorphéniramine maléate pour la même activité.

Dans ce travail, la CPG, l'HPLC et la CPG/SM seront utilisées pour analyser :

- La matière première de la dexchlorphéniramine maléate (DCM) selon la pharmacopée Européenne. Cette analyse passera par la détermination :
    - des substances apparentées par CPG.
    - de la pureté énantiomérique de la matière par HPLC chirale.

- La DCM (produit fini) sous forme de comprimés. HPLC et CPG seront utilisées.
    - Le dosage de la DCM dans la forme solide sera effectué par HPLC après validation complète de la technique retenue.
    - Le test de dissolution du comprimé sera contrôlé par CPG en utilisant la bromphéniramine comme étalon interne.
- La DCM dans le plasma sera quantifiée par CPG/SM et une courbe pharmacocinétique sera établie.

Le mémoire présentant les résultats de notre travail comporte cinq chapitres :

Le deux premiers chapitres sont consacrés à la bibliographie sur :

- Les propriétés physico-chimiques et pharmacologiques du maléate de dexchlorphéniramine et des méthodes d'analyse de cette substance.
- La validation analytique en HPLC.

Les techniques d'analyse utilisées au cours de notre travail sont décrites dans le troisième chapitre. Il s'agit essentiellement de :

- La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ;
- La chromatographie en phase gazeuse (CPG) ;
- La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) ;

Une partie expérimentale, dans laquelle nous présentons les différentes techniques analytiques utilisées et les conditions opératoires choisies, constitue le quatrième chapitre.

Dans le dernier chapitre, les résultats obtenus concernant le contrôle physicochimique de la matière première, l'optimisation et la validation des méthodes de dosage de la dexchlorphéniramine dans les préparations pharmaceutiques, sa quantification dans le plasma ainsi que sa biodisponibilité in vitro seront interprétés et discutés.

Revues

Bibliographiques

I-1 Généralités sur les médicaments

I-1-1 Définitions

La définition du médicament est donnée par l'article L.5 111-1 du CSP.

« On entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical, ou restaurer, corriger, modifier leurs fonctions organiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » [1].

Un générique peut être défini comme la copie d'un médicament original, dont la production et la commercialisation sont rendues possible par l'expiration de la protection, conférée par le brevet couvrant le principe actif original [2].

I-1-1-1 Le principe actif

Le principe actif (PA) est une molécule biologique, minérale ou organique, naturelle ou synthétique, qui confère au médicament son activité thérapeutique. L'activité biologique et la toxicité de cette molécule sont appréciées par des tests appropriés et comparatifs [1].

Les principes actifs sont désignés par une appellation abrégée en un mot, la dénomination commune. Celle-ci rappelle de plus ou moins loin la formule chimique, qui serait évidemment inutilisable en langage courant, et surtout, comporte un suffixe commun pour les produits apparentés. Elle est officialisée par l'OMS, d'où le nom de dénomination commune internationale ou DCI [3].

I-1-1-2 Les excipients

Substance ou mélange de substances inactives par elle même sur la maladie, qui sont utilisées dans la formulation pour faciliter la préparation du médicament. Les excipients peuvent jouer un rôle important dans la libération du principe actif à partir du médicament et par la même améliorer la biodisponibilité [4].

I-1-2 Les antihistaminiques

Les antihistaminiques sont des substances chimiques représentant la famille de médicaments la plus prescrite dans le monde [5]. Ils s'opposent, par antagonisme compétitif, aux effets de l'histamine, notamment sur la peau, les vaisseaux et les muqueuses conjonctivales, nasales, bronchiques et intestinales [6].

Ils ne s'opposent pas aux réactions antigène/anticorps, ni à la libération d'histamine. Par ailleurs, beaucoup de produits ont un ou plusieurs effets pharmacologiques parallèles, par exemple atropinique ou adrénolytique [7].

Les antihistaminiques constituent un groupe hétérogène de molécules qu'il est habituel de diviser en molécules de première génération (anti-H_1), souvent anciennes, atropiniques et sédatives, et en molécules de deuxième génération, récentes, peu ou non atropiniques ni sédatives [8].

Les antihistaminiques de première génération appartiennent à plusieurs classes chimiques qui ont leurs caractéristiques propres. Ils sont dotés de diverses propriétés centrales et périphériques, comme les alkylamines, les éthanolamines, les phénothiazines et les pipéridines.
Les alkylamines sont des antihistaminiques efficaces à des petites doses. Elles entrainent peu d'effets secondaires et une sédation faible [9-10].

Plusieurs antihistaminiques anti-H_1 sont utilisés depuis plus de cinquante ans dans le traitement de diverses manifestations d'origine allergique [11]. Parmi lesquels on trouve le maléate de dexchlorphéniramine.

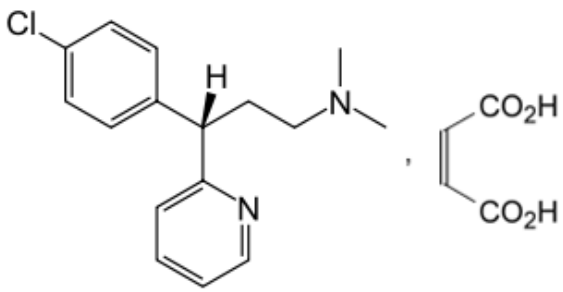
I-1-3 Propriétés physico-chimiques du maléate de dexchlorphéniramine

Le maléate de dexchlorphéniramine est un antagoniste des récepteurs H_1 de l'histamine, qui est souvent utilisé dans le traitement de l'allergie [12]. Cet antihistaminique est un sédatif (à cause de l'effet anti-cholinergique). Il est également utilisé comme antitussif [13].

Sa popularité dans le monde entier comme un antihistaminique est basée sur son efficacité à faible coût (comme un générique) et sa tolérance, avec des effets secondaires négligeables [12].

La dexchlorphéniramine (DCP) est une propylamine commercialisée sous forme de sel du maléate de dexchlorphéniramine [14], qui est une poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, très soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, dans le méthanol et dans le chlorure de méthylène [7-15]. Les différentes propriétés physicochimiques de la DCP sont regroupées dans le tableau 1.

Tableau 1. *Quelques propriétés physico-chimiques du maléate de DCP.*

Nom du produit	POLARAMINE®
Dénomination Commune Internationale (DCI)	Dexchlorphéniramine maléate
Dénomination chimique selon IUPAC	(*Z*)-Butènedioate de (3*S*)-3-(4-chlorophényl)-3-(pyridin-2-yl)-N,N-diméthylpropan-1-amine
Formule moléculaire	
Formule brute	$C_{20}H_{23}ClN_2O_4$
Poids moléculaire (g/mol)	390,9
Point de fusion (°C)	110 à 115
Pk_a	4 et 9,2
Pouvoir rotatoire	22 -23

La dexchlorphéniramine est un composé dibasique (figure1). L'ionisation étant un phénomène dépendant du pH, il est important de tester l'influence de ce facteur sur la rétention de DCP pour connaître la forme prédominante (en milieu aqueux).

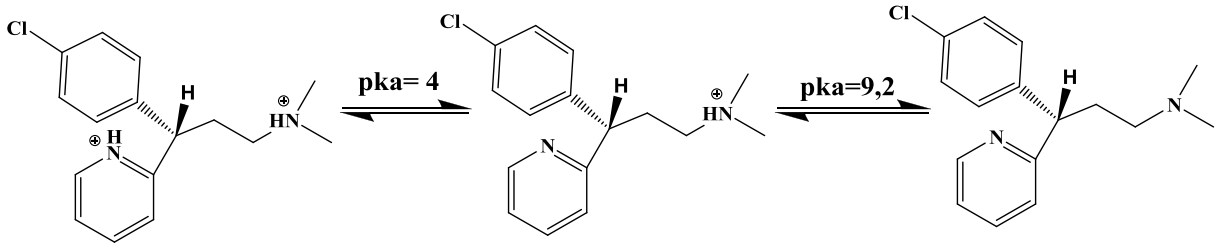


Figure 1. *Equilibre acido-basique de la dexchlorphéniramine.*

La chlorphéniramine est un médicament chiral qui fait partie de la famille chimique des alkylamines tertiaires [16]. Elle est commercialisée sous forme de mélange racémique de (-) (R)-CP et (+) (S)-CP et sous forme énantiopure.

Les études à l'aide de la méthode de dialyse à l'équilibre ont montré une stéréosélectivité de la fixation pour chaque énantiomère. La (S)-(+)-chlorphéniramine se fixe plus fortement que son antipode optique aux protéines totales plasmatiques, à l'albumine et à l'alpha-glycoprotéine [18]. C'est pourquoi la dose du maléate de chlorphéniramine utilisée sera doublée par rapport à celle de dexchlorphéniramine maléate pour avoir la même activité [19].

D'un point de vue thérapeutique, l'utilisation des énantiomères purs actifs doit présenter un avantage significatif sur les racémates, concrétisé par une plus grande efficacité thérapeutique, la suppression d'éventuels effets secondaires ou une amélioration des propriétés pharmacocinétiques, pour pouvoir justifier leur développement et leur mise sur le marché [20].

Cependant, la molécule active, le (*Z*)-Butènedioate de (3*S*)-3-(4-chlorophényl)-*N*,*N*-diméthyl-3-(pyridin-2-yl)propan-1-amine ou le maléate de dexchlorphéniramine est susceptible de contenir les impuretés de synthèse suivantes (figure 2) [14] :

- (3*R*)-3-(4-chlorophényl)-*N*,*N*-diméthyl-3-(pyridin-2-yl)propan-1-amine (*Impuretés B*).
- (3*RS*)-3-phényl-3-(pyridin-2-yl)-*N*,*N*-diméthylpropan-1-amine (phéniramine) (*Impuretés A*).

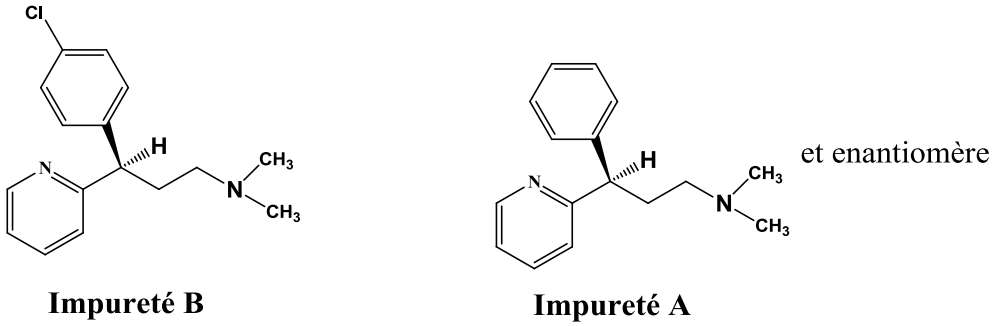


Figure 2. *Structures chimiques des impuretés du maléate de dexchlorphéniramine.*

I-1-4 La pharmacocinétique du maléate de dexchlorphéniramine

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme. C'est une étape importante pour comprendre l'action d'un médicament et pour améliorer son efficacité [21]. On peut distinguer schématiquement quatre étapes dans la pharmacocinétique d'un médicament (*ADME*).

a) *A*bsorption

La dexchlorphéniramine est administrée par voie orale (comprimés, sirop). Il existe un effet de premier passage hépatique important. Sa biodisponibilité est comprise entre 25 et 50%. Le temps pour atteindre la concentration plasmatique maximale est de 2 à 6 heures.

b) *D*istribution

L'effet maximal est obtenu 6 heures après la prise du principe actif. La durée d'action varie entre 4 à 8 heures. La liaison aux protéines plasmatiques est de 72% [22].

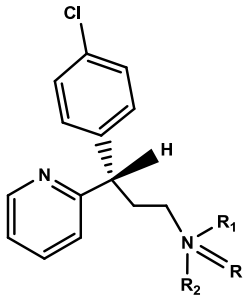
c) *M*étabolisme

La chlorphéniramine est métabolisée au niveau hépatique. La métabolisation conduisant à trois métabolites inactifs : la première consiste en une N-deméthylation qui conduit à la formation de chlorphéniramine N-oxyde (CPNO) (tableau 2).

Le cytochrome impliqué dans la formation de ce métabolite est le CYP2D6. Les deux autres métabolites sont le desméthyl-chlorphéniramine (DCP) et le disdesméthyl-chlorphéniramine (DDCP) [12].

Tableau 2. *Structures des métabolites de la Chlorphéniramine.*

	R	R_1	R_2
CPNO	O	CH_3	CH_3
DCP		CH_3	H
DDCP		H	CH_3



d) Élimination

L'élimination est majoritairement rénale et dépend du pH urinaire, avec une proportion comparable de produit éliminé sous forme inchangée ou métabolisée. La demi-vie est comprise entre 14 et 25 heures [22-27].

Chapitre II

Différentes Étapes du contrôle d'un médicament

II-1 Contrôle de qualité du principe actif

Un principe actif doit être obtenu sous une forme standardisée, reproductible d'un lot de fabrication à l'autre et aussi pure que possible. Les normes auxquelles il doit satisfaire sont fixées par la pharmacopée ou précisées dans le dossier préalable à leur autorisation d'utilisation [28].

Selon l'article R-S001 du CSP, une Pharmacopée est un « recueil contenant la nomenclature des drogues, des médicaments simples et composés, et des articles officinaux. Elle indique les caractères des médicaments, les moyens qui permettent de les identifier, les méthodes d'essais et d'analyses à utiliser pour assurer leur contrôle, les procédés de préparation, de stérilisation, de conservation des médicaments ainsi que les règles de leur conditionnement, leurs principales incompatibilités et un ensemble de données qui peuvent être utiles au pharmacien pour leur préparation et leur délivrance » [30].

Il existe plusieurs Pharmacopées avec entre autre :

- **La Pharmacopée Française :** peu utilisée par rapport à la Pharmacopée Européenne.
- **La Pharmacopée Européenne (Ph Eur) :** publiée par le Service Européen de la Qualité du Médicament du Conseil de l'Europe de Strasbourg. C'est la 6ème édition de la Pharmacopée Européenne qui est actuellement applicable.
- **La Pharmacopée Américaine (USP) :** créée en 1900 et dénommée « United States Pharmacopeia Convention».
- **La Pharmacopée Britannique (Br. Ph) :** dénommée « British Pharmacopoeia».
- **La Pharmacopée Japonaise (JP)**

L'analyse d'un médicament est codifiée par une monographie qui est un protocole d'analyse d'une matière première ou d'un produit fini [32]. Les monographies de la pharmacopée préconisent trois étapes qui sont :

II-1-1 L'identification : elle est réalisée par des tests simples (pouvoir rotatoire, CCM, IR…)

II-1-2 Les essais : peuvent être, soit des essais quantitatifs, soit des essais limites portant sur les impuretés contenues dans un échantillon. Ils représentent la garantie que toutes les procédures d'analyse permettent une évaluation de la teneur en impuretés de la substance à analyser [33]; par exemple :

II-1-2-1 Essai de substances apparentées

Le chemin de synthèse des principes actifs peut être décrit par un schéma réactionnel comportant plusieurs étapes. Ces étapes peuvent générer des produits intermédiaires retrouvés à l'état de traces dans le produit fini. Ces traces portent le nom de substances apparentées. Leurs qualités et leurs quantités sont fixées dans les différentes pharmacopées [34].

II-1-2-2 Pureté énantiomérique

Quelle que soit l'activité pharmacologique présentée par le distomère, sa présence à côté de l'énantiomère parent doit être considérée comme celle d'une impureté [35].

II-1-2-3 Métaux lourds

Ce test a pour but de démontrer que la teneur en impuretés métalliques, dans les conditions d'essais spécifiées, ne dépasse pas la limite fixée dans la monographie, exprimée en pourcentage (en poids) de plomb dans la substance d'essai, qui est déterminé par comparaison visuelle concomitante [36].

II-1-2-4 Solvants résiduels

Les solvants, y compris l'eau, font partie intégrante du procédé d'obtention d'un médicament. Compte tenu de leur conséquence éventuellement négative sur le plan pharmaceutique, leurs teneurs résiduelles doivent être aussi faibles que possibles [37].

II-1-3 Le dosage : a pour objet de mesurer la quantité de substance à analyser contenue dans un échantillon donné [33].

II-2 Validation d'une méthode d'analyse de médicament

Pour assurer l'uniformité de tous les lots d'un médicament présenté sous une ou plusieurs formes pharmaceutiques, il est nécessaire d'établir une norme appropriée pour l'identité, la pureté, le comportement et d'autres caractéristiques. C'est le strict respect de ces normes qui permet d'obtenir la qualité souhaitée [29].

Les normes de qualité peuvent être soit publiées soit confidentielles. Les normes publiées sont en général présentées sous forme d'une monographie et sont énoncées en des termes permettant de procéder à l'évaluation objective du produit. Les monographies établies par la Pharmacopée Européenne sont donc des normes officielles applicables dans les préparations pharmaceutiques [29].

Un médicament ne peut être mis sur le marché s'il n'a pas été autorisé conformément par des signataires compétents qui font plusieurs contrôles. Parmi ces contrôles, on trouve par exemple, le contrôle des matières premières, le contrôle du produit fini, la validation des méthodes [31].

La validation des procédures analytiques quantitatives est aujourd'hui largement répandue dans touts les domaines d'activité où des mesures sont réalisées [39]. Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et fini et les essais de stabilité. Le contrôle analytique des produits pharmaceutiques est indispensable pour garantir que le médicament en question restera sûr et efficace pendant toute la durée de validité proposée, c'est-à-dire pendant les phases de stockage, de distribution et d'utilisation. Ce contrôle doit autant que possible être effectué selon les normes élaborées et validées lors de la mise au point du produit [40].

II-2-1 Objectif

L'objectif de la validation est de donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la vraie valeur inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure [41].

II-2-2 Définition d'une validation analytique

Opération permettant d'assurer qu'un résultat a été obtenu dans des conditions techniques satisfaisantes. La validation analytique est résumée comme incluant des tests pour confirmer la linéarité, la spécificité, la fidélité, les limites de détection, les limites de quantification, et la robustesse [43].

II-2-3 Critères de validation

L'industrie pharmaceutique exige que toute méthode d'analyse doit être validée avant son utilisation routinière [42]. Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus [39].

Les critères sont les suivants :

- Spécificité
- Linéarité
- Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)
- Exactitude
- Limite de détection (LOD)
- Limite de quantification (LOQ)
- Robustesse
- Stabilité

II-2-3-1 Spécificité

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser [39].

Pour vérifier qu'il n'y a pas d'interférence des excipients, il faut faire une linéarité avec des étalons chargés en excipients et les comparer à ceux réalisés avec les étalons seuls [44].

II-2-3-2 Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de concentrations à fournir des résultats proportionnels à la quantité en substance à doser dans l'échantillon [39].

Cette proportionnalité s'exprime à travers une expression mathématique définie par une droite du 1er ordre $y = a + bx$. Elle est vérifiée par le calcul des constantes de droite ainsi que du coefficient de corrélation en utilisant la méthode des moindres carrés (régression linéaire) [45].

Ce dernier doit être de l'ordre de 0,99.

II-2-3-3 Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites [46].

La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. La fidélité peut être évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire [47].

- La répétabilité : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opératoire, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (variabilité intra-série) [48].
- La fidélité intermédiaire : est la fidélité issue des répétitions effectuées sur un même échantillon dans des conditions différentes (jours différents, manipulateurs différents) [49].

- La 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; (elle est rarement utilisée) [48].

II-2-3-4 Exactitude

L'exactitude représente l'accord entre la valeur mesurée et la valeur vraie ou conventionnellement vraie [39]. Elle est calculée à partir des résultats de la fidélité.

On détermine :

- La moyenne Y_m de tous les résultats de la fidélité.
- Le pourcentage de récupération.

La valeur du pourcentage de récupération PR est comprise entre deux valeurs limites qui sont :

$$\mathrm{LI} < PR < LS$$

LS : Limite supérieure

LI : Limite inférieure

II-2-3-5 Robustesse

C'est la capacité d'une méthode d'analyse à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de cette procédure [50].

II-2-3-6 Limite de détection

La limite de détection est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais pas nécessairement quantifiée, à l'aide d'une méthode spécifique, dans les conditions expérimentales imposées. Cette valeur est égale à la concentration donnant un signal égal au triple du signal correspondant au bruit de fond [51].

$$LOD = 3 \times bruit\ de\ fond$$

II-2-3-7 Limite de quantification

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte pouvant être détectée avec une précision et une exactitude acceptable [33].

$$LOQ = 10 \times bruit\ de\ fond$$

II-2-3-8 Stabilité

Un médicament est considéré comme pratiquement stable lorsque, dans un laps de temps déterminé, ses propriétés essentielles ne changent pas ou changent au plus dans des proportions tolérables; de plus le médicament doit être conservé dans des conditions appropriées et prescrites de température, d'humidité et d'exposition à la lumière et qu'un récipient convenable a été utilisé [52].

Chapitre III

Techniques utilisées pour le dosage

III-1 Les Méthodes Chromatographiques

Il existe deux grands types de chromatographie, en fonction de la phase mobile utilisée : la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase liquide (CPL), qui regroupe la chromatographie sur colonne à pression atmosphérique, ou sous pression (communément nommée HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography*), la chromatographie d'échange d'ions, d'exclusion stérique, d'affinité, d'interactions hydrophiliques-hydrophobiques et la chromatographie sur couche mince [53].

La chromatographie est le principal outil d'analyse de l'industrie pharmaceutique [55]. Son principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire (emprisonnée dans la colonne) et la phase mobile qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure,...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité...). A leur arrivée au bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange [54].

III-1-1 La Chromatographie Liquide à Haute performance (HPLC)

La Chromatographie liquide à haute performance (HPLC), constitue l'une des méthodes séparatives largement employées dans le domaine de l'analyse pharmaceutique [55]. Cette méthode permet la séparation et la quantification de composés en solution élués à travers une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile, elle-même percolée grâce à une pression élevée.

Dans notre travail, nous avons utilisé la HPLC en mode inverse où le facteur prédominant dans la rétention est le partage. Elle se base sur les différences de solubilité des composés dans deux phases non miscibles ; la phase stationnaire et la phase mobile ou l'éluant. Les composés doivent être solubles dans les deux phases mais avec des solubilités différentes. Plus un composé sera soluble dans la phase stationnaire plus il restera longtemps dans la colonne [56].

Un appareil de chromatographie en phase liquide comporte quatre parties: système de pompage, injecteur, colonne et détecteur (figure 3).

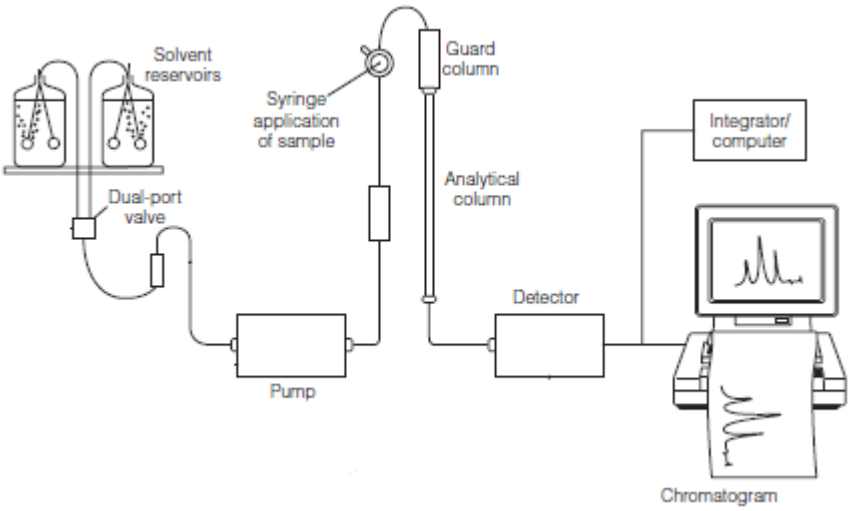


Figure 3. *Schéma d'un chromatographe en phase liquide* [76].

III-1-2 La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode puissante car elle permet de séparer des mélanges complexes de produits organiques volatils et semi-volatils [57].

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse dans l'injecteur (figure 3), qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de colonne. La colonne se présente comme un tube enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire. Elle est placée dans une enceinte à température régulée appelée le four, car la température joue un rôle essentiel sur la séparation.

La phase gazeuse passe ensuite dans un détecteur avant de sortir de l'appareil où les composés séparés sont détectés et un pic apparaît sur l'enregistreur. Il est important de noter que dans le cas de la CPG, les interactions ne se produisent qu'entre l'analyte et la phase stationnaire [58].

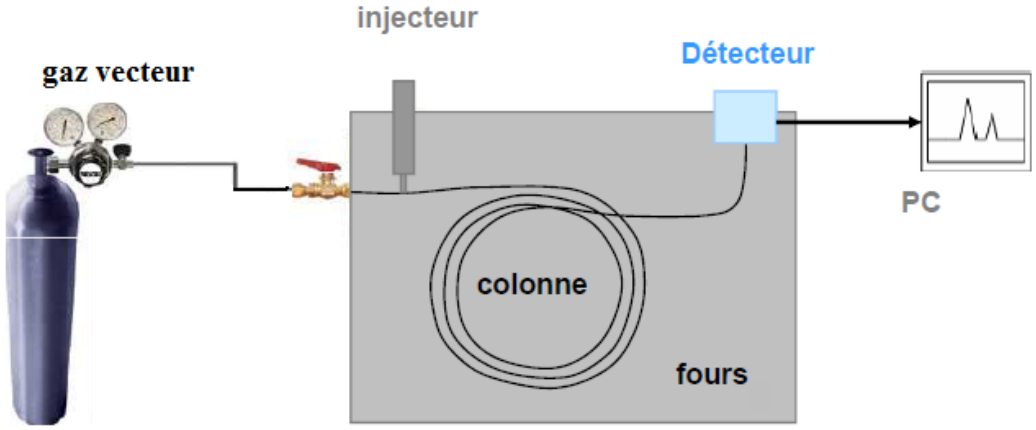


Figure 4. *Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.*

- **Le Détecteur à Ionisation de Flamme (FID)**

Ce détecteur est considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques (figure 5). Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimenté par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et des particules chargées, responsables du passage d'un courant ionique extrêmement faible (10^{-12} A) entre deux électrodes (ddp de 100 à 300 V).

L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation. La seconde électrode, de forme annulaire, entoure la flamme. Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable [60].

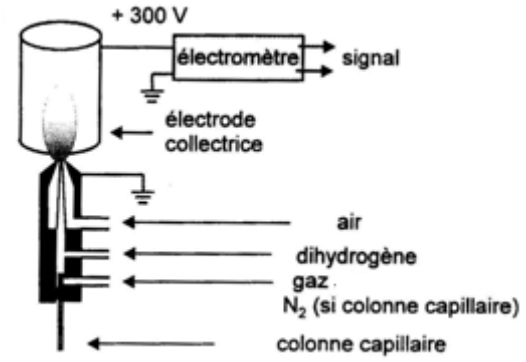


Figure 5. *Représentation schématique du détecteur à ionisation de flamme.*

III-1-3 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est un outil puissant employé dans l'analyse. Elle permet d'obtenir une véritable carte d'identité du composé qui peut être comparée aux cartes de références (bibliothèques de spectres) [64].

La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse sont des techniques analytiques qui ont connu des développements historiques très différents. L'association de ces techniques lors du couplage CPG/SM est une méthode fiable et puissante [65].

L'intérêt de la CPG/SM en analyse des échantillons biologiques repose à la fois sur sa sensibilité et sa robustesse. Ce couplage repose sur l'utilisation de sources à impact électronique, qui souvent ne permettent pas d'observer la masse du composé, mais seulement des ions issus de sa

fragmentation, ce qui rend délicate toute identification de composés inconnus, ou non décrits dans les bases de données [66].

III-1-3-1 Définition

Un spectromètre de masse est un appareil qui permet de caractériser des analytes, par la mesure des rapports de masse sur charge (*m/z*) de molécules ionisées et de leurs produits de fragmentation. La spectrométrie de masse peut apporter des informations relatives à la masse moléculaire d'un composé et des informations structurales. Elle peut également permettre une mesure de la quantité.

III-1-3-2 Principe général de fonctionnement d'un spectromètre de masse

Tous les spectromètres de masse possèdent trois éléments en commun : une source, un analyseur et un détecteur (figure 6) [67-68]. Les molécules sont introduites dans la source où sont formés les ions. Ces derniers sont guidés vers l'analyseur où ils sont séparés, puis vers le détecteur. Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un logiciel qui permet également d'assurer le pilotage du spectromètre [69].

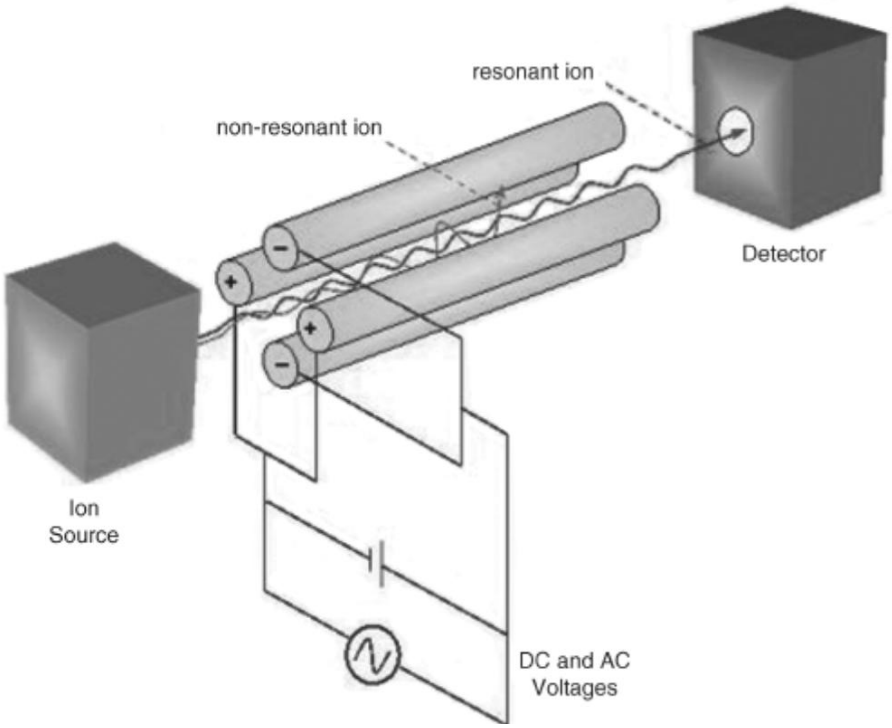


Figure 6. Représentation simplifiée d'un Spectromètre de Masse [68].

III-1-4 Grandeurs utilisées en chromatographie

Les grandeurs utilisées en chromatographie pour caractériser une méthode de séparation concernent essentiellement la colonne [59].

III-1-4-1 Facteur de capacité

Chaque composé élué sort avec un temps de rétention t_r représentant le temps séparant l'injection du produit et la sortie du composé [58]. Les composés non retenus sortent avec un temps de rétention nommé t_0 (ou t_m), correspondant au volume mort de la colonne.

Le facteur de capacité est une mesure du temps de rétention d'un composé corrigé par le temps d'élution d'un composé non retenu.

$$k' = (t_r - t_0)/t_0$$

Avec :

t_r : temps de rétention du composé mesuré à partir de l'injection (en minutes).

t_0 : temps de rétention du composé non retenu [59].

III-1-4-2 Sélectivité

La sélectivité α est une grandeur qui permet de caractériser la distance qui sépare le sommet de deux pics chromatographiques consécutifs 1 et 2 [60].

$$\alpha = (t_{r2} - t_0)/(t_{r1} - t_0) = k_2' \ / \ k_1'$$

t_{r1} : temps de rétention du premier composé.

t_{r2} : temps de rétention du deuxième composé.

III-1-4-3 Efficacité

L'efficacité d'une colonne est caractérisée par son nombre de plateaux théoriques *N* [61]. On appelle plateau théorique la portion de phase stationnaire dans laquelle un soluté est en équilibre de répartition entre la phase mobile et la phase stationnaire.

$$N=16(t_r/w)^2$$

W : largeur du pic à la base.

III-1-4-4 Résolution

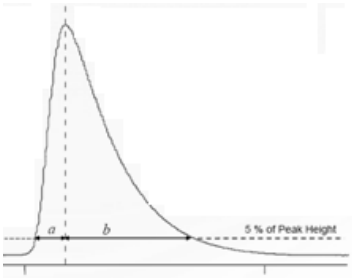
La résolution R_s mesure la séparation qui existe entre deux pics chromatographiques. Plus R_s est grand, meilleure est la séparation [62]. Si les pics chromatographiques sont gaussiens, elle est définie par la relation suivante :

$$R_s = 2[(t_{r2}-t_{r1})/ (W_1+W_2)]$$

III-1-4-5 Facteur de symétrie (ou trainée du pic)

En HPLC, un pic idéal tend vers une courbe d'aspect gaussien. Il est possible de calculer la symétrie du pic par l'intermédiaire du facteur T_f, qui est le rapport entre la largeur du pic au 1/20 de sa hauteur et la distance entre la perpendiculaire abaissée du sommet du pic et le bord d'entrée au 1/20 de sa hauteur [62].

$$T_f = W_{0,05}/2A$$



$W_{0,05}$: largeur du pic au 1/20 de sa hauteur (en minutes).

A : distance entre la perpendiculaire abaissée du sommet du pic et le bord d'entrée au 1/20 de sa hauteur (en minutes).

Les valeurs idéales de T_f sont comprises entre 0,8 et 1,3. Le pic est alors symétrique. Si le pic présente une trainée d'entrée, T_f sera inférieur à 1, s'il présente une queue, T_f sera supérieur à 1,5 [63].

III-2 Les Méthodes de purification

Au cours des études de pharmacocinétique, il est nécessaire de quantifier les médicaments et leurs métabolites éventuels dans des milieux biologiques complexes comme, par exemple, le sang total, le plasma, le sérum, les urines, la bile, les matières fécales, les tissus, etc [70].

Plus la matrice est complexe, plus il y aura de molécules interférentes. Elles sont d'origine endogène ou exogène, organique ou minérale (protéines, lipides, phospholipides, acides biliaires, médicaments, ions…). Le plasma est constitué de 90 % d'eau et contient des électrolytes, des protéines (75 g/L) dont l'albumine, des globulines ainsi que des lipides. Les molécules d'intérêt en pharmacologie ne représentent alors qu'une infime partie de cette matrice. Une extraction idéale serait réalisée grâce à un solvant organique qui permettrait de n'extraire que le soluté et de laisser dans la matrice toutes les autres substances. Un tel solvant organique n'existe pas. En pratique le solvant devra être le plus sélectif possible vis-à-vis du soluté [71].

Les méthodes d'extraction liquide-liquide (LLE) permettent le transfert d'un soluté initialement contenu dans une phase liquide vers une autre phase liquide non miscible (figure 7). Elles sont couramment employées en pharmacologie/ toxicologie afin de purifier et concentrer les échantillons préalablement à une analyse par méthodes chromatographiques.

L'extraction liquide-liquide est connue pour générer des extraits relativement propres avec un bon coefficient d'extraction. C'est souvent la méthode de choix pour quantifier de très faibles concentrations d'un composé (de l'ordre du pg/ml).

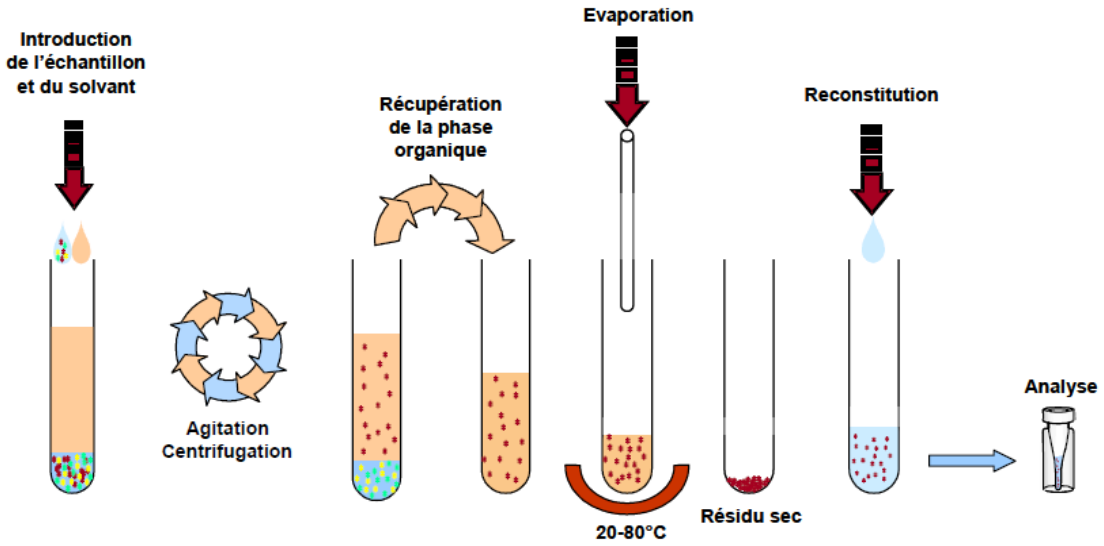


Figure 7. *Principe de l'extraction liquide-liquide (LLE).*

Cette méthode reste très largement utilisée pour la préparation des échantillons biologiques. En outre, l'extraction liquide-liquide permet également la concentration de l'analyte. Cette technique est basée sur le partage de l'analyte entre une phase aqueuse et une phase organique non miscibles [72].

Partie

Expérimentale

Notre travail porte sur le dosage d'un produit médicamenteux, le maléate de dexchlorphéniramine, en suivant toutes les étapes de la monographie de contrôle physico-chimique de la matière première, du produit fini ainsi que sa quantification dans les milieux biologiques.

IV.1 Partie I : *Détermination de la pureté énantiomérique, recherche des impuretés et dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans la matière première selon la pharmacopée.*

IV-1 Matériel et méthodes

a)Matériel

- Polarimètre de type SCHMIDT+HAENSCH
- Spectroscopie FT-IR de type *Nicolet 560*
- Four à moufle
- pH mètre HANNA pH 211

b) Réactifs et produits

- Acétonitrile pour HPLC (SIGMA ALDRICH)
- Méthanol pour HPLC (SIGMA ALDRICH)
- Dichlorométhane (Fluka)
- Hexane (SIGMA ALDRICH)
- Acétate de diéthylamine (RiEDEL-DE HAËNAG)
- Carbonate de sodium anhydre
- Oxyde de magnésium
- réactif au thioacétamide
- Nitrate d'argent
- Acide acétique glacial 99-100 % (RiEDEL-DE HAËN)
- Acide sulfurique 98% (Fluka)

- Acide chlorhydrique (SIGMA ALDRICH)
- Acide nitrique (Cheminiva)
- Acide orthophosphorique 85% (Merck)
- Solution d'acide perchlorique 0.1 M
- Le maléate de Dexchlorphéniramine (MP)
- Le maléate de Bromphéniramine SCR

La monographie utilisée pour cette analyse est tirée de la 6ème Edition de la Pharmacopée Européenne (2008). Elle préconise trois étapes :

IV-1-1 Identification

IV-1-1-1 Pouvoir rotatoire spécifique

Dans une fiole de 20 ml, nous avons dissout 2 g de DCM dans 20 ml de l'eau purifiée. La lecture est effectuée à l'aide d'un polarimètre étalonné avec de l'eau purifiée.

IV-1-1-2 Spectroscopie infrarouge

L'étude par FT-IR est réalisée avec un appareil de marque *Nicolet 560.* La matière première étudiée a été préparée à l'état solide sous forme de pastille dans du KBr. Le spectre obtenu est comparé à celui du maléate de dexchlorphéniramine SCR.

IV-1-1-3 Test des Chlorures

Dans un creuset de porcelaine, nous avons introduit 0,15 g de maléate de dexchlorphéniramine et 0,5 g de carbonate de sodium anhydre. Le mélange est chauffé sur une flamme nue pendant 10 min, puis on laisse refroidir. Le résidu est reconstitué dans 10 ml d'acide nitrique dilué. Ensuite, 1 ml du filtrat est dilué par 1 ml d'eau. La solution précédente est acidifiée par l'acide nitrique dilué (3,17 M) et 0,4 ml de solution de nitrate d'argent (17 g/L) sont ajoutés. Après agitation, il se forme un précipité blanc caillebotté.

Le précipité obtenu après centrifugation est lavé trois fois avec 1 ml d'eau. Cette opération est effectuée rapidement, à l'abri de la lumière. Le résidu est maintenu en suspension dans 2 ml d'eau auxquels on ajoute 1,5 ml d'ammoniac.

Le témoin est préparé dans les mêmes conditions en utilisant un mélange de 10 ml de solution à 5 ppm en ions chlorures et de 5 ml d'eau.

IV-1-2 Essai

IV-1-2-1 Substances apparentées

- **Appareillage**

Le chromatographe utilisé est un Perkin Elmer Auto System XL Gaz, menu d'un injecteur Split/Splitless travaillant en mode split et d'un détecteur à ionisation de flamme F.I.D.

L'azote est utilisé comme gaz vecteur à un débit compris entre 1 et 1,8 ml/min.

- **Mode Opératoire**

Solution à examiner : 200 mg de maléate de dexchlorphéniramine ont été dissouts dans 5 ml de chlorure de méthylène.

Conditions Chromatographiques utilisées

Tableau 3. *Conditions chromatographiques utilisées.*

Gaz vecteur	N_2
Détecteur	FID
Colonne	OV 17
Débit	1 ml/min
Température de la colonne	190 °C
Température de l'injecteur	250 °C
Température de détecteur	250 °C
Volume injecté	1µl

IV-1-2-2 Pureté énantiomérique

La méthode analytique utilisée consiste à séparer les énantiomères par chromatographie en phase liquide sur une colonne chirale à base de β-cyclodextrine (CYCLOBOND I). La phase mobile est un mélange d'acétate de diéthylamine à 0,25% ajusté à pH 4,4, de méthanol et d'acétonitrile {85:7.5:7.5, (v/v/v)}. Les énantiomères sont détectés par spectrométrie UV à 220 nm. Le débit est de 0.5 ml/min [12].

- *Solution à examiner* : nous avons préparé une solution à 25 ng/ml de DCM dans l'éthanol. Un volume de 20 µl de cette solution est injecté dans le chromatographe.

IV-1-2-3 Métaux lourds

- *Solution à examiner*

Dans un creuset de platine, nous avons introduit une prise d'essai égale à 1,0 g de maléate de dexchlorphéniramine et 0,5 g d'oxyde de magnésium. La calcination est réalisée au rouge sombre jusqu'à obtention d'une masse blanche à blanche grise homogène.

Cette masse est chauffée à 800 °C pendant 1 h environ. Le résidu obtenu est reconstitué avec 5 ml d'un mélange à volumes égaux d'acide chlorhydrique (5,5 M) et d'eau où 0,1 ml de solution de phénolphtaléine est introduit. On ajoute de l'ammoniac concentrée jusqu'à coloration rose. Après refroidissement, nous avons ajouté de l'acide acétique glacial jusqu'à décoloration, puis 0,5 ml en excès et complété à 20 ml avec de l'eau pure.

A 12 ml de la solution obtenue, nous avons ajouté 2 ml de solution tampon à pH 3,5 et 1,2 ml de réactif au thioacétamide et on mélange immédiatement.

- *Solution témoin*

En parallèle, nous avons préparé le témoin en ajoutant à 0,5 g d'oxyde de magnésium 2 ml de solution à 10 ppm de plomb. L'ensemble est séché à l'étuve à 100-105 °C.

Dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'essai, nous avons procédé à la calcination, à la reprise chlorhydrique, à l'addition d'ammoniaque, puis à celle d'acide acétique jusqu'à l'addition de réactif au thioacétamide.

- *Solution à blanc*

Préparée en utilisant un mélange de 10 ml d'eau et de 2 ml de la solution obtenue à partir de la substance à examiner. Le témoin, comparé à l'essai et à blanc, doit montrer une légère coloration brune.

Après 2 min, la coloration brune éventuelle de la solution obtenue à partir de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle du témoin.

IV-1-2-4 Cendres sulfuriques

Un creuset de platine a été préparé pour cette étude, chauffé au rouge pendant 30 min et pesé après refroidissement dans un dessiccateur. Dans ce dernier, nous avons introduit 1,0 g de la substance à examiner et 2 ml d'acide sulfurique. Le mélange est chauffé prudemment sur une flamme nue jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement de fumées blanches. La calcination est réalisée à 600 °C environ jusqu'à disparition des particules noires.

Après refroidissement, on pèse à nouveau le creuset et on calcule le pourcentage de résidu. Si la quantité du résidu ainsi obtenue dépasse la limite indiquée, on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique, puis le chauffage et l'incinération sont réalisés comme précédemment pendant une période de 30 min jusqu'à ce que le pourcentage de résidu soit conforme à la limite prescrite.

IV-1-2-5 Perte à la dessiccation

La dessiccation de maléate de dexchlorphéniramine est effectuée dans l'étuve à 65 °C pendant 4 h sur 1,0 g de la matière première. La perte à la dessiccation ne doit pas être supérieure à 0,5 pour cent.

IV-1-3 Dosage

Nous avons dissout 0,15 g de maléate de dexchlorphéniramine dans 25 ml d'acide acétique anhydre. Le point de fin de titrage est déterminé par potentiométrie en utilisant une solution d'acide perchlorique 0,1 M.

IV-2 Partie II : *dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans le* comprimé

IV-2-1 Étude de la biodisponibilité in vitro (test de dissolution)

- **Appareillage**

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un appareillage approprié appelé « dissolutest », composé d'un bain thermostaté à 37°C, dans lequel baignent six réacteurs. Ces récipients sont remplis d'un milieu de dissolution approprié et sont maintenus sous agitation, par un système de palettes dans lequel les comprimés sont placés. La vitesse et la durée d'agitation sont normalisées par la pharmacopée américaine USP [73].

Conditions opératoires

Tableau 4. *Protocole du test de dissolution.*

Appareil	ERWEKA à palette tournante
Milieu de dissolution	*Eau*
Volume du milieu	*500 ml*
Température du milieu de dissolution	*37 ± 0,5*
Vitesse de rotation	*50 tr/min*
Temps d'analyse	*45 min*

Trois lots du médicament générique de DCM dosé à 2 mg sont destinés à cette opération (en utilisant six comprimés pour chaque lot).

- ***Méthode de dosage***

La pharmacopée américaine (USP 30ème édition) propose une méthode de dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans le milieu de dissolution basée sur la chromatographie en phase gazeuse.

- **Préparation de la solution standard**

Deux solutions ; une solution étalon de dexchlorphéniramine à 90 µg/ml et de son étalon interne (bromphéniramine SCR) à 12,5 µg/ml sont préparées dans l'eau pure. A 5 ml de la solution étalon, nous avons ajouté 10 ml de l'eau purifiée et 1 ml de l'étalon interne. Le mélange est ajusté à pH 11 par une solution concentré d'hydroxyde de sodium. Ensuite, nous avons ajouté 3 ml de l'hexane. Le mélange est centrifugé pendant 3 minutes et le surnageant récupéré est concentré sous courant d'azote pour l'analyse.

- **Préparation des solutions à examiner**

Pour chaque récipient : une portion de 15 ml du milieu de dissolution a été prélevée dans des tubes de 50 ml. Dans chaque tube, nous avons ajouté 1 ml de l'étalon interne. Le pH du mélange est ajusté à 11. Après, nous avons ajouté 3 ml d'hexane. Le mélange est centrifugé pendant 3 minutes et le surnageant est concentré sous courant d'azote pour l'analyse.

Les échantillons préparés précédemment sont injectés dans le chromatographe en respectant les conditions suivantes :

Tableau 5. *Conditions chromatographiques utilisées.*

Gaz vecteur	Azote
Détecteur	FID
Colonne	carbowax 20M
Débit	1ml/min
Température de la colonne	205 °C
Température de l'injecteur	250 °C
Température de détecteur	250 °C
Volume injecté	2µl

IV-2-2 Validation de la méthode du dosage de dexchlorphéniramine dans le comprimé

La procédure d'analyse a été entièrement validée conformément aux procédures décrites dans les lignes directrices de l'ICH (Q2).

IV-2-2-1 Mise au point de la méthode et optimisation des conditions

Le but est de fixer les meilleures conditions opératoires qui permettront le dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans le comprimé.

Nos essais concernent des modifications apportées à la phase mobile de manière à les optimiser. En revanche, la colonne, le débit, la force ionique et les conditions de détection sont maintenus constants.

Matériel et méthodes

a) Matériel

- Une pompe Jasco PU-980 (intelligent hplc pump).
- Un dégazeur waters IN-LINE degasser.
- Un injecteur Rhéodyne 7725 muni d'une boucle de 20 µl.
- Un détecteur Waters PDA 996 couplé à un ordinateur Digital PC muni d'un logiciel spécialisé de référence Empower
- Colonne en acier inoxydable Ascentis® C8, 250 mm x 4.6 mm, 5µm

b) Réactifs et produits

- Dexchlorphéniramine maléate (MP).
- Acétonitrile pour HPLC (Sigma Aldrich).
- Dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 (Prolabo).
- Acide ortho phosphorique à 85% (Merck).

- **Préparation des phases mobiles**

Afin d'obtenir un test fiable, différentes phases mobiles ont été testées. Elles sont constituées d'un mélange acétonitrile / tampon phosphate. Le tampon a été préparé à différents pH en utilisant une eau purifiée et du phosphate mono potassique. La concentration est maintenue constante à 50 mM. Le pH est ajusté par l'acide ortho-phosphorique pour obtenir la valeur du pH appropriée. Le débit a été maintenu constant à 1,0 ml/min. Les différentes compositions de la phase mobile sont regroupées dans le tableau 6.

Tableau 6. *Pourcentage d'ACN dans les phases mobiles étudiées.*

pH	***Eluant***	
	% Tampon	***% Acétonitrile***
2,5	80 70 60	20 30 40
3	80 70 60	20 30 40
3,5	80 70 60	20 30 40
4	80 70 60	20 30 40
4,5	70 60	30 40
5	70 60	30 40

Chaque phase mobile a été dégazée pendant 5 minutes au moyen d'un bain à ultrasons avant son utilisation. La détection a été réalisée par UV à 261 nm.

IV-2-2-2 Validation de la méthode

Cette partie de l'étude permet de valider la méthode d'analyse mise au point précédemment. Elle s'effectue en plusieurs étapes et permet de vérifier la linéarité, la spécificité, l'exactitude et la précision de la méthode.

IV-2-2-2 -1 Spécificité (1)

Afin de vérifier qu'il n y a pas d'interférences d'excipient au temps de rétention de DCP, nous avons préparé une solution de placebo surchargée en excipients avec une concentration identique à celle d'une solution de PA à 100 %.

IV-2-2-2-2 Linéarité

L'étude de la linéarité est réalisée sur le principe actif seul. L'intervalle de concentration à valider est couvert par une série de cinq concentrations, régulièrement espacées : 50, 75, 100, 125 et 150 % de la concentration théorique de la DCP. Ces solutions sont indépendantes et sont réalisées à partir de pesées différentes, comme indique le tableau suivant.

Tableau 7. *Préparation des solutions pour la linéarité.*

N° de la solution	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
Poids PA (mg)	5	7,5	10	12,5	15
Qsp diluant (ml)	25	25	25	25	25
Dilution (ml)	5 ml de la SM et complété à 50 ml par le même diluant				
% PA	50	75	100	125	150
[PA] en mg.L^{-1}	20	30	40	50	60

Chaque solution est injectée dans le chromatographe cinq fois dans le désordre et dans le même jour.

IV-2-2-2-3 Spécificité (2)

L'étude de la spécificité est faite simultanément sur la forme pharmaceutique reconstituée c'est-à-dire un mélange de tous les composés correspondants, quantitativement et qualitativement à la forme pharmaceutique à étudier, sauf la substance à analyser qui sera ajoutée en quantité variable permettant ainsi une comparaison directe avec la linéarité obtenue précédemment.

Le protocole suivi lors de la préparation de ces solutions est décrit dans le tableau suivant.

Tableau 8. *Préparation des solutions pour la spécificité.*

N° de la solution	***Placebo (mg)***	***Poids PA (mg)***	***Qsp diluant (ml)***	***Dilution (ml)***	***% PA***
S1	365	5	25	5 ml de la SM dans 50 ml de diluant	50
S2	365	7,5	25		75
S3	365	10	25		100
S4	365	12,5	25		125
S5	365	15	25		150

N.B : les échantillons sont filtrés sur membrane millipore à 0,45 µm à l'aide d'une seringue avant la dilution. Chaque solution est injectée cinq fois dans le désordre.

IV-2-2-2-4 Fidélité

Nous avons effectué deux séries de quatre mesures par deux manipulateurs sur deux jours différents. Les solutions de la fidélité sont préparées à partir du produit fini à 100% en PA.

- **Préparation des solutions à examiner**

Après le broyage de 50 comprimés, nous avons transféré l'équivalent de cinq comprimés du générique de DCM dans une fiole de 25 ml contenant 5 ml de diluant et complété au volume avec le même solvant. Après, nous avons transféré 5 ml de cette solution dans une fiole de 50 ml et complété avec le même diluant. Les solutions sont filtrées avant leur injection (filtres millipore de 0,45 µm).

Chaque solution est injectée deux fois par deux manipulateurs dans le désordre.

Diluant : mélanger 10 ml de l'acide ortho phosphorique à 85% dans 1000 ml de l'eau purifiée.

IV-2-2-2-5 Exactitude

La détermination de ce paramètre ne nécessite pas de manipulations. Les données sont issues de la fidélité.

IV-2-2-2-6 Limite de détection & Limite de quantification

Pour déterminer la LOD et la LOQ, nous avons laissé passer la phase mobile dans la colonne pendant 20 min, en calculant par suite le bruit de fond.

IV-2-2-2-7 Robustesse

Les tests de robustesse comprennent seulement les paramètres liés à la méthode, c'est-à-dire le pH apparent de la phase mobile, la longueur d'onde de détection et d'autres facteurs quantitatifs explicitement prescrits par le protocole [73].

Dans notre cas, nous avons effectué des modifications sur la composition de la phase mobile et nous avons vérifié l'influence du pH, le débit et la longueur d'onde d'absorption sur la rétention du principe actif.

- Le pH : 2,9 ; 3 et 3,1
- Le débit : 0,9 ; 1 et 1,1.
- La longueur d'onde (λ): 259 ; 261 et 263 nm.

IV-2-2-2-8 Stabilité

La solution à 100 % utilisée dans la linéarité est divisée en deux, la première moitié à été maintenue à 4°C, la seconde à température ambiante. A des temps précis, les prélèvements de 20 µl sont effectués et analysés.

IV-3 Partie III: *dosage de la dexchlorphéniramine dans le plasma*

IV-3-1 Matériel et méthodes

a) Matériel utilisés

- Centrifugeuse
- pH mètre HANNA pH 211

b) Présentation de la CPG/SM

Le système chromatographique en phase gazeuse utilisé est un TRACE DSQ GC/MS Thermo separation équipé d'un injecteur vaporisateur à température programmable travaillant en mode Split 1/60, couplé à un spectromètre de masse à ionisation électronique (EI-MS) en mode SIM, le tout étant piloté par un logiciel spécialisé de donné.

La séparation est réalisée sur une colonne capillaire de type DB5 MS, 15 m, ID 0.25mm, 0.25 µm d'épaisseur de film, composée de 5% diphényle et 95% diméthylpolysiloxane.

b) Réactifs et produits

- Acétate d'éthyle (Fluka).
- Sodium tetraborate decahydrate (pro analysis)
- Le maléate de dexchlorphéniramine (MP)
- Le maléate de bromphéniramine (SCR)

IV-3-2 Evolution de la biodisponibilité in vivo

Cinq rats femelles de race *wistar* dont le poids moyen est de 250 g sont sélectionnés pour cette étude. Pour chaque rat, nous avons administré 0,1 mg/ml d'une solution saline du maléate de dexchlorphéniramine par voie intra péritonéale.

Les prélèvements veineux par ponction du sinus rétro-orbitaire après une légère anesthésie ont été effectués à des intervalles de temps précis : 1h, 2h, 2 h30, 3h et 5 h.

Après centrifugation à 4000 tr/min des prélèvements sanguins, le plasma est récupéré. Il subit une congélation à -25°C. Il est décongelé avant l'extraction pour l'analyse.

- **Préparation de la solution de l'étalon interne**

La solution mère de l'étalon interne a été préparée par dissolution d'environ 2,5 mg du maléate de bromphéniramine dans 25 ml d'acétonitrile suivie d'une dilution au cinquantième avec un mélange acétonitrile-eau (1/1) pour obtenir une solution de référence contenant 2500 ng/ml de l'EI.

- **Préparation de la solution tampon**

Le tampon borate a été préparé en faisant dissoudre 2,0122 g de $Na_2B_4O_7$, 10 H_2O dans 500 ml de l'eau pure. Cette solution est ajustée à pH 9 par l'acide borique 20 mM.

IV-3-3 Extraction des échantillons

A 0,5 ml de plasma nous avons ajouté 0,1 ml de la solution d'étalon interne 1 ml de tampon borate est vortéxé pendant une minute. Le mélange est ensuite transféré dans une ampoule à décanter de 50 ml dans laquelle 2 ml d'acétate d'éthyle sont ajoutés. L'extraction par l'acétate d'éthyle est répétée trois fois (3x2 ml). Les phases organiques sont rassemblées puis évaporées sous courant d'azote [74].

Les extraits secs sont repris par 1mL de dichlorométhane dont 1µL est injecté dans le chromatographe.

Résultats

&

Discussion

V.1 Partie I : *Détermination de la pureté énantiomérique, recherche des impuretés et dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans la matière première selon la pharmacopée*

Plusieurs méthodes d'analyse ont été utilisées pour le dosage de la matière première. Ces méthodes d'analyse préconisées par la pharmacopée sont entre autres : la chromatographie liquide haute performance (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la spectroscopie IR et le dosage potentiométrique.

L'analyse visuelle de la matière première du maléate de dexchlorphéniramine portant sur les critères d'aspect et de solubilité a donné une poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche très soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol, dans le méthanol et dans le chlorure de méthylène.

V-1-1 Identification

Le test d'identification permet de vérifier l'identité de la substance indiquée sur l'étiquette. Conformément aux monographies.

D'après la monographie de la dexchlorphéniramine maléate, trois tests sont suffisants pour identifier notre substance (A, C et E).

V-1-1-1 Pouvoir rotatoire spécifique (test A)

Le pouvoir rotatoire spécifique peut être employé pour vérifier la pureté d'un énantiomère. Cette méthode est moins sensible que la chromatographie chirale mais elle nous donne une idée sur la présence ou non de l'autre énantiomère.

La valeur obtenue est : $[\alpha]_{D}^{20} = 22{,}15$

D'après la monographie du maléate de dexchlorphéniramine, ce résultat est conforme aux normes exigées ($+22 \leq \alpha \leq +23$).

V-1-1-2 Spectroscopie IR (test C)

La spectroscopie IR a été utilisée pour caractériser les groupements fonctionnels présents dans la substance à analyser. Les spectres de la matière première et de la substance de référence effectués en mode de transmission sont représentés dans la figure 8.

La bande située à 2900 cm^{-1}, de faible intensité, est attribuée aux vibrations d'élongation *C-H* des groupes alkyles CH_2 et CH_3.

Les deux bandes aux environs 2360 cm^{-1} et 2340 cm^{-1} se distinguent dans tout le spectre, elles seraient dues aux vibrations ν(*N-H*) provenant des sels d'amines tertiaires.

Une bande intense située autour de 1360 cm^{-1} correspond aux vibrations de la liaison *C-N* de l'amine.

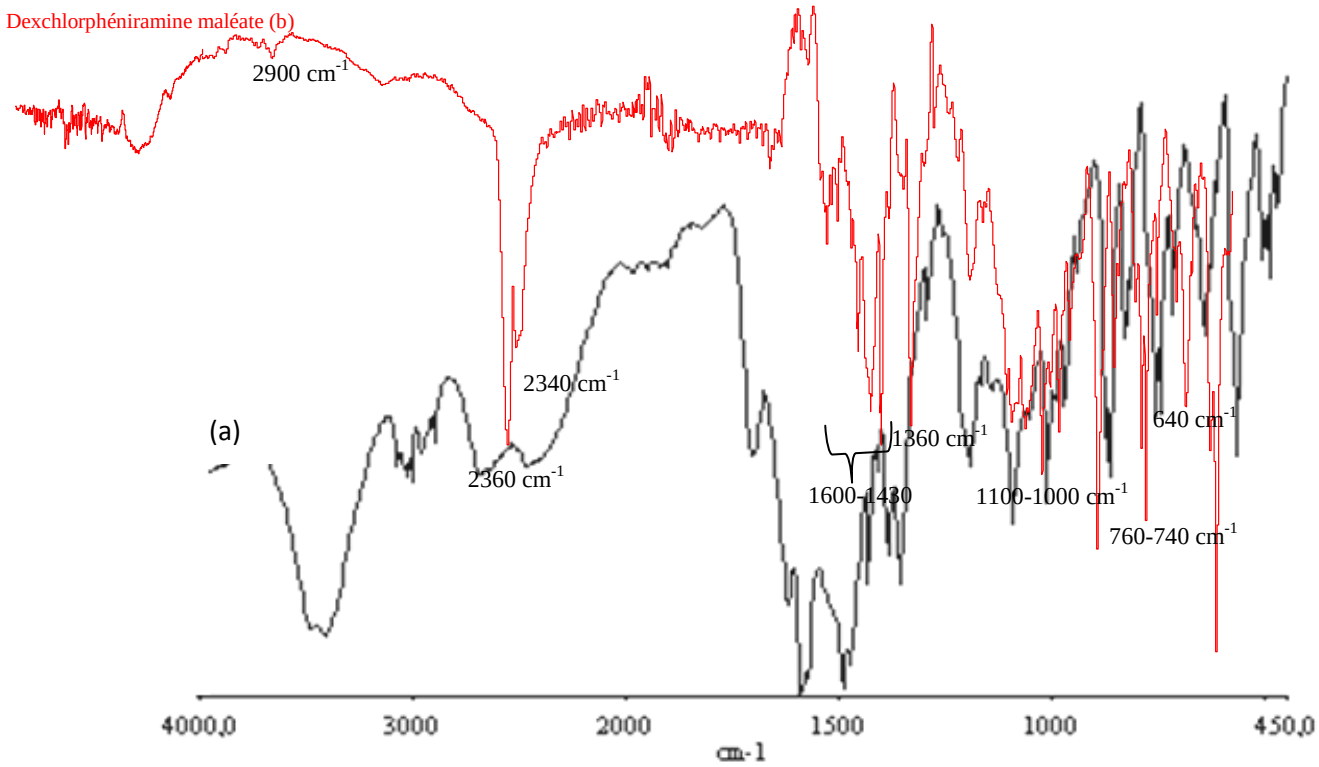


Figure 8. *Spectres IR du maléate de dexchlorphéniramine SCR (a) et de sa matière première(b).*

Un certain nombre de bandes situées entre 1600 cm^{-1} et 1430 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation $C=C$; $C=N$ du cycle pyridinique.

Les différentes bandes situées entre 600 cm^{-1} et 1250 cm^{-1} sont difficilement attribuables. Elles peuvent correspondre notamment aux vibrations $C\text{-}H$ hors du plan (740-760 cm^{-1}) et dans le plan (1000-1240 cm^{-1}) des cycles aromatiques ou de déformations angulaires $C=C$ du cycle (650 cm^{-1}), voire au balancement de CH_2 d'alcanes (750-730 cm^{-1}).

Comparativement à son spectre de référence, il n'y a pas ou peu de différences entre les deux spectres sauf pour une bande située entre 3400-3600 cm^{-1} correspondant aux vibrations de la molécule d'eau présente dans le spectre de référence mais moins marquée dans le spectre de l'échantillon.

Cette analyse infrarouge indique que l'échantillon présente un squelette d'une alkylamine avec un caractère basique marqué. Les deux spectres sont presque superposables dans la région qui s'étale de 2300 à 500 cm^{-1}, ce qui nous permet de dire que la matière première est conforme.

V-1-1-3 Test des Chlorures (test E)

Le test limite pour identifier les ions chlorures des groupes fonctionnels est basé sur leur précipitation avec le nitrate d'argent en présence de l'acide nitrique dilué.

Après 5 min à l'abri de la lumière, la solution à examiner présente une faible opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle du témoin.

Le précipité se dissout facilement en présence de NH_3 à l'exception d'éventuelles particules qui se dissolvent lentement. Le test E est jugé conforme.

V-1-2 Essai

Le lot de principe actif utilisé lors du contrôle physico-chimique de la matière première sert à identifier et à doser la dexchlorphéniramine dans les produits finis. Il est également utilisé pour les études de stabilité.

Toute erreur sur la détermination de leur pureté provoque une erreur sur le dosage chromatographique du principe actif.

Il convient de distinguer la pureté chromatographique et la pureté qui tient compte aussi des impuretés supplémentaires (métaux lourds, cendres, solvants résiduels,…).

V-1-2-1 Substances apparentées

La méthode décrite pour le dosage et l'essai des substances apparentées est une chromatographie en phase gazeuse. Les substances apparentées quantifiées sont décrites dans la Ph Eur mais la méthode utilisée est celle de l'USP.

La figure 9 représente le chromatogramme correspondant. La dexchlorphéniramine est éluée à un temps de 5,5 minutes environ. On observe un pic juste avant celui de la dexchlorphéniramine qui correspond à l'impureté A.

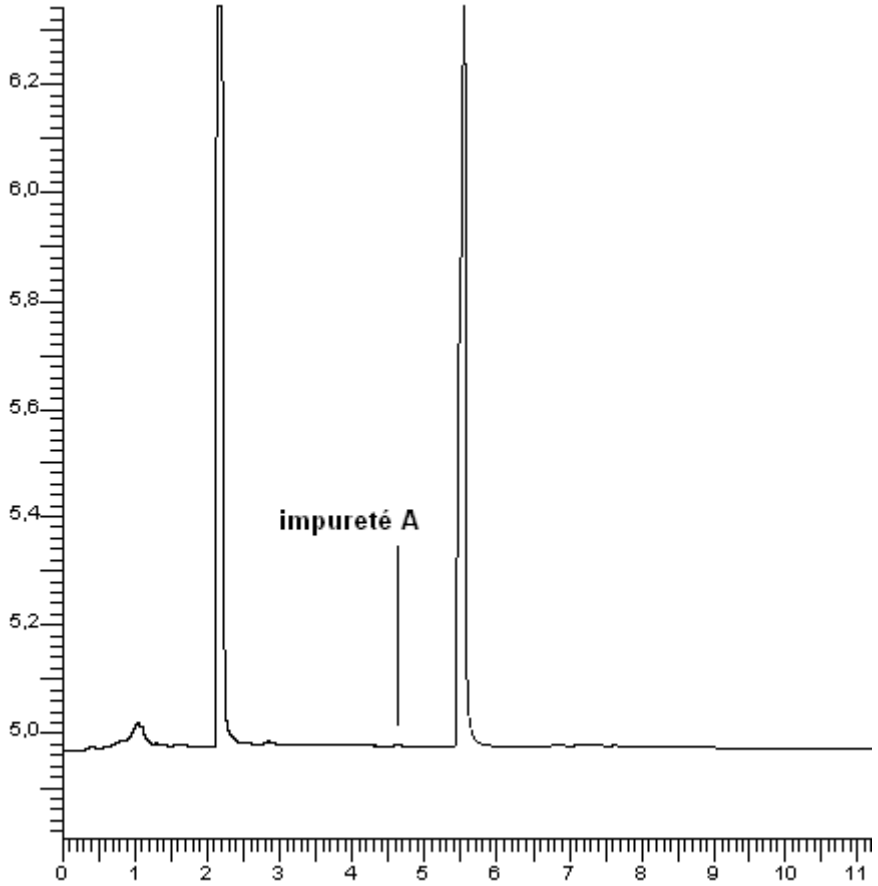


Figure 9. *Chromatogramme de dexchlorphéniramine et de ses impuretés.*

Comme il est couramment pratiqué dans la monographie de DCP, la quantification des substances apparentées est simplement évaluée en prenant le pourcentage des aires de tous les pics issus de l'échantillon à l'exception du pic de solvant et du maléate s'il a été présent.

La valeur de la teneur en dexchlorphéniramine trouvée est 99,3%, donc 0,7 % correspond à l'ensemble des impuretés qui ont été détectées. Les limites d'acceptabilité ont été fixées à 1 %, selon les normes de la Ph Eur et de l'USP, donc le résultat est conforme.

La méthode envisagée dans cette étude nous a permis d'observer un seul pic d'impureté correspondant à l'impureté A dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

V-1-2-2 Pureté énantiomérique

La chromatographie liquide chirale est utilisée pour identifier et quantifier l'impureté énantiomèrique. La séparation des deux énantiomères a été effectuée sur une colonne à base de β-cyclodextrine. L'injection d'une solution de Chlorphéniramine maléate nous a permis de vérifier la nature de l'impureté.

	Temps de rétention	Surface	% Surface	Norme
Isomère **R**	23,773	10041	**0,77**	≤ 2 %
Isomère S	25,036	1294550	99,23	

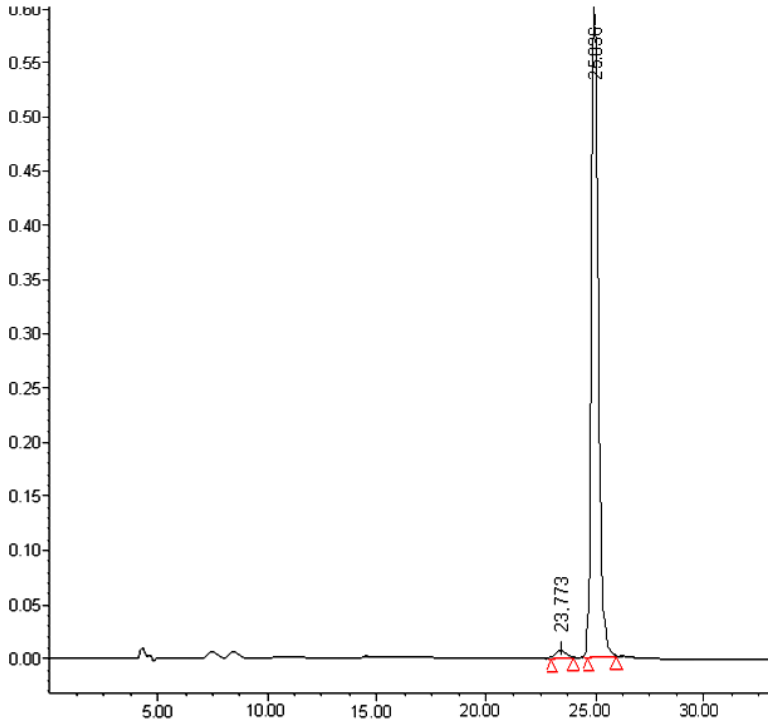


Figure 10. *Chromatogramme de l'impureté énantiomérique du maléate de dexchlorphéniramine.*

Dans le chromatogramme obtenu, les énantiomères sont élués en 25 minutes environ (Figure 10). Dans ces conditions, le pic de l'isomère *R* (de l'impureté B) est élué le premier.

Selon le test de pureté énantiomérique décrit dans la monographie du maléate de DCP, la teneur maximale de cette impureté chirale tolérée est de 2 %.

La teneur en impureté B obtenue avec cette méthode est de 0,77 % ; elle est conforme à la pharmacopée. Nous avons obtenu une bonne énantiorésolution égale à 2,4 entre les deux énantiomères.

Les résultats de cette analyse ont montré que la matière première est conforme à l'essai de la pureté énantiomérique.

V-1-2-3 Perte à la dessiccation

Dans la préparation d'une substance active ou de la forme galénique qui la contient, l'opération de dessiccation est une étape pratiquement indispensable.

La dessiccation a pour but d'enlever totalement ou partiellement l'eau contenue dans un produit solide. Cet essai permet de déterminer la proportion de tous les produits volatils susceptibles d'être éliminés dans des conditions spécifiques, le plus souvent l'eau et les solvants organiques [75].

La valeur trouvée est égale à 0,32 %. La limite d'acceptabilité ne doit pas être supérieure à 0,5 pour cent, donc le test est déclaré conforme selon les normes de la pharmacopée Européenne.

V-1-2-4 Métaux lourds

Ce test est fourni pour démontrer que la teneur des impuretés métalliques qui précipitent à pH = 3,5 par l'action de réactif capable de les engendrer (Thioacétamide hydrolysé en milieu alcalin) ne dépasse pas la limite de métaux lourds indiquée dans la monographie.

Elle est déterminée par une comparaison visuelle concomitante. La couleur de la solution de l'échantillon ne doit pas être plus prononcée que celle de la solution standard.

La solution témoin montre une légère coloration brune comparée à la solution à blanc. Par contre, la solution de contrôle est pratiquement claire comparativement à la solution témoin (*solution à 10 ppm de Pb)* ce qui veut dire que la matière première du maléate de DCP est conforme à l'essai.

V-1-2-5 Cendres sulfuriques

Les cendres sulfuriques sont le résidu obtenu, après incinération d'un produit à haute température, exprimé généralement en pourcentage en masse par rapport à la matière sèche.

La teneur en cendre est déterminée par la pesée du résidu obtenu après incinération d'une prise d'essai dans un four à moufle à une température de 600 ^{0}C jusqu'à combustion complète de la matière organique [76].

La valeur trouvée est : 0,09 %.

D'après la monographie du maléate de DCP, le taux des cendres sulfuriques n'est pas supérieur à 0,1 pour cent. On peut conclure que la matière première est conforme à l'essai.

V-1-3 Dosage

La méthode du dosage potentiométrique permet de déterminer la teneur de la matière première en dexchlorphéniramine.

Il s'agit ici d'un titrage non-aqueux dans l'acide acétique glacial avec de l'acide perchlorique [77]. Le point d'équivalent a été déterminé en appliquant la méthode graphique. Le volume à l'équivalence V_{eq} est obtenu facilement après la dérivation de la courbe de titrage (figure11).

1 ml d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 19,54 mg de $C_{20}H_{23}ClN_2O_4$.

Le volume corrigé vaut 7,77 ml et la prise d'essai corrigée est de 151,51 mg. Après le calcul, la teneur en dexchlorphéniramine est 100,21 %.

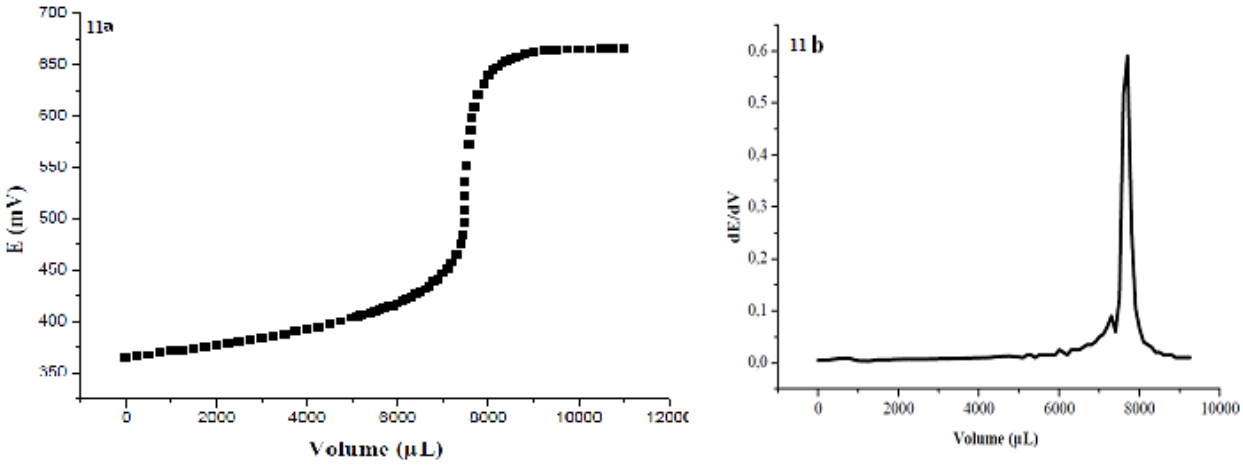


Figure 11. *Courbes typiques de titrage potentiométrique (11a) et de sa dérivée (11b) du maléate de DCP.*

Selon la Pharmacopée, la matière première doit contenir au minimum 98 % et au maximum 100,5 % du principe actif. La valeur trouvée est de 100,21 % du principe actif alors le résultat est conforme.

Récapitulation des paramètres physicochimiques de la matière première

Lorsque toutes les déterminations décrites dans les monographies sont conformes aux normes, on peut considérer les lots comme acceptés. La marge de tolérance est celle des monographies utilisées.

Les résultats du contrôle physico-chimique du maléate de dexchlorphéniramine comme matière première, sont conformes aux normes définies par la Pharmacopée Européenne.

Le lot de la matière première précédemment contrôlé est destiné à la fabrication du produit fini (comprimés et sirop).

Le tableau 9 regroupe les résultats des différents tests de la pharmacopée réalisés sur la matière première du maléate de dexchlorphéniramine.

Tableau 9. *Résultats du contrôle physicochimique de DCP.*

	Test	*Valeur trouvée*	*Normes*	*Résultats*
Identification	*Pouvoir rotatoire*	22,15	+ 22 à + 23	Conforme
	Spectroscopie IR	Spectre IR	Spectre de référence	Conforme
	Test des Chlorures	Une faible opalescence	Solution témoin	Conforme
Essai	*Substances Apparentées*	0,7 %	Total : au maximum 1 %	Conforme
	Pureté énantiomérique	0,77 %	Au maximum 2 pour cent	Conforme
	Métaux lourds	inférieur à 10 ppm	Au maximum 20 ppm	Conforme
	Cendres sulfuriques	0,09 %	Au maximum 0,1 %	Conforme
	Perte à la dessiccation	0,32 %	0,5 %	Conforme
	pH	4,8	4,5 à 5,5	Conforme
Dosage	*Dosage potentiométrique*	100,21	98 à 100,5 %	Conforme

V-2 Partie II : *dosage du maléate de dexchlorphéniramine dans le comprimé*

V-2-1 Étude de la biodisponibilité in vitro (test de dissolution)

C'est un test quantitatif comparativement aux autres tests. Il permet donc au galéniste de prévoir l'importance du phénomène d'absorption in vivo du principe actif étudié dans sa formulation. Il offre la possibilité de s'assurer de la libération et de la dissolution du principe actif. En un mot ce test permet de tester la conformité de la formulation [78].

Les essais de dissolution des comprimés de dexchlorphéniramine ont été menés selon la monographie décrite par l'USP à l'aide d'un appareil à palettes tournante.

Les surfaces des pics de la dexchlorphéniramine (DCP) et celles de bromphéniramine (BP) sont regroupées dans le tableau 10.

Tableau 10. *Surfaces des pics de DCP et de son étalon interne obtenues.*

N° du Cp	Lot 901		Lot 902		Lot 903		Témoin	
	DCP	**BP**	**DCP**	**BP**	**DCP**	**BP**	**DCP**	**BP**
1	6504	7654	6574	7087	8591	9099	8304	7963
2	6301	7865	6544	7144	8133	9133		
3	6901	7433	6971	6980	8976	9532		
4	6122	7399	6329	7344	7990	9022		
5	6233	7123	6441	7689	8765	9154		
6	6653	7544	6743	7233	8871	9843		

Le volume total du milieu de dissolution est suffisant pour permettre une dissolution totale du principe actif. Nos essais seront considérés comme satisfaisants si on a passage en solution d'une proportion donnée de principe actif dans le temps prescrit.

La chromatographie en phase gazeuse est un mode d'analyse adapté pour le dosage de la dexchlorphéniramine libéré dans le milieu de dissolution d'où la limite de détection dans ces conditions est de l'ordre de µg/ml.

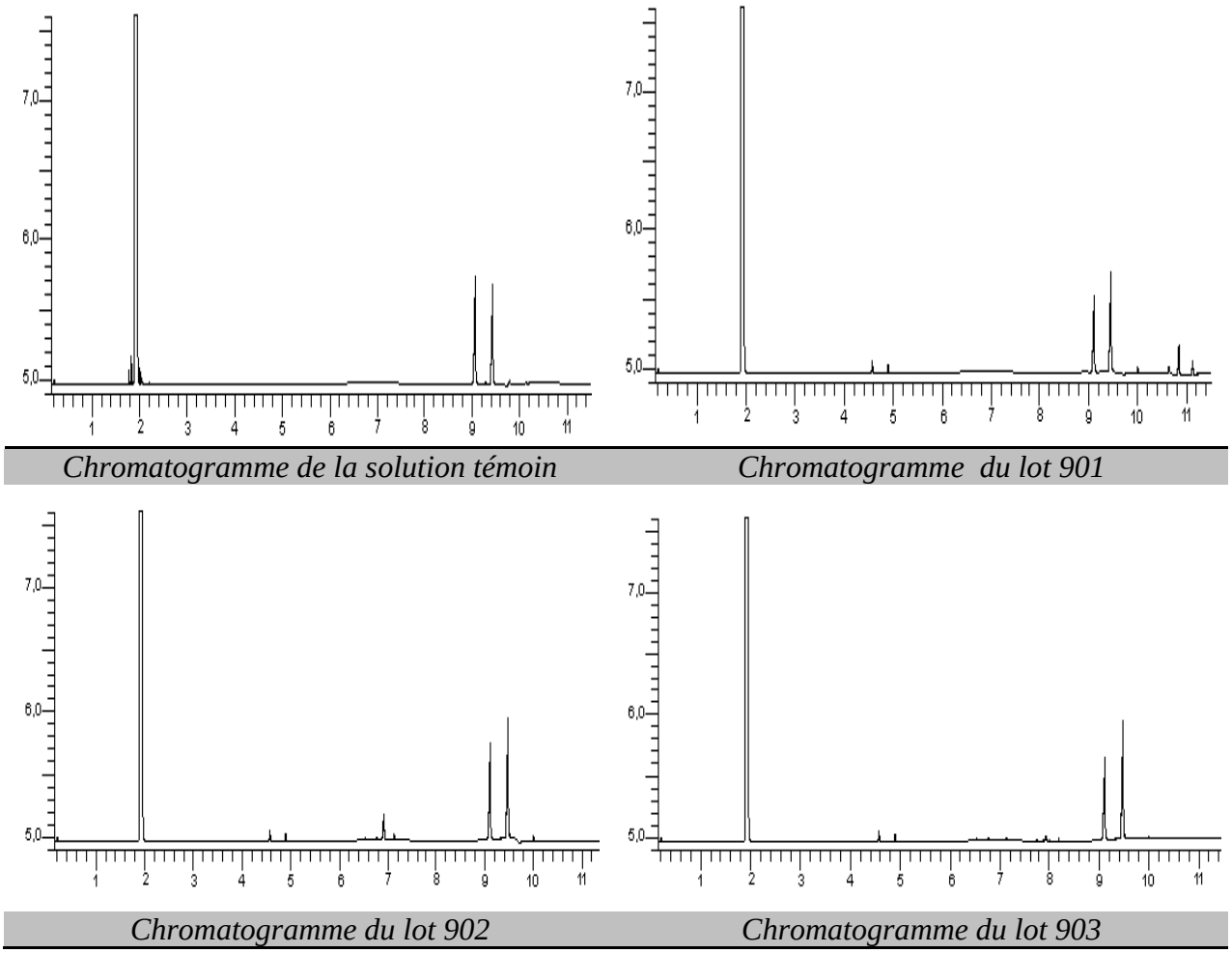


Figure 12. *Profils Chromatographiques obtenus du test de dissolution.*

Les pics obtenus sont fins, symétriques et bien séparés dans un temps d'analyse totale de dix minutes (figure12). Les temps de rétention sont respectivement de 9,1 et 9,5 min, pour la dexchlorphéniramine et pour son étalon interne.

Le calcul des rapports de surfaces de la molécule d'intérêt (DCP) sur l'EI (BP), permet d'évaluer les concentrations du principe actif libérées dans le milieu de dissolution en appliquant la méthode de l'étalonnage interne. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 11.

Tableau 11. *Concentrations de la DCP libérées dans le milieu de dissolution.*

	Concentrations ($\mu g.mL^{-1}$)					
Lot	Cp N° 1	Cp N° 2	Cp N° 3	Cp N° 4	Cp N° 5	Cp N° 6
901	73,33	69,14	80,12	71,40	75,51	76,1
902	80,05	79,05	86,18	74,37	72,29	80,45
903	81,48	76,85	81,27	76,42	82,63	77,77

En appliquant une règle de trois, il a ensuite été possible d'estimer le pourcentage de la DCP libéré dans le milieu de dissolution (tableau12).

Tableau 12. *Pourcentage des concentrations de DCP libérées dans le milieu.*

	% de la dissolution du maléate de DCP dans le milieu					
Lot	Cp N° 1	Cp N° 2	Cp N° 3	Cp N° 4	Cp N° 5	Cp N° 6
901	81,5	76,8	89,0	79,3	83,9	84,6
902	89,0	87,8	95,8	82,6	80,3	89,4
903	90,5	85,4	90,3	84,9	91,8	86,4

Selon la 30ème édition de l'USP, pour être conforme à l'essai de dissolution, 70 % au moins du principe actif doit être dissout en 45 minutes.

D'après ces résultats, nous constatons que les comprimés dosés à 2 mg que nous avons analysés dans les trois lots sont conformes aux normes exigées. En effet, ils contiennent respectivement 82,51 ; 87,48 et 88,21 %, valeurs appartenant au domaine préconisé par la pharmacopée. Le pourcentage de principe actif dissout en 45 min, est conforme à la pharmacopée pour toutes les spécialités.

V-2-2 Validation de la méthode de dosage de dexchlorphéniramine dans le comprimé

V-2-2-1 Mise au point de la méthode et optimalisation des conditions

- ***Recherche des conditions chromatographiques optimales d'analyse***

Pour établir les conditions chromatographiques optimales, l'influence du pH et la composition en acétonitrile de l'éluant sur trois paramètres de rétention sont examinées. Nous avons calculé les paramètres de conformité suivants: Nombre de plateaux théoriques $\mathcal{N}$, facteur de trainé $\mathcal{T}_f$ et le facteur de capacité $\mathcal{K}'$, afin d'évaluer la qualité du système chromatographique retenu. Différents essais ont été réalisés pour évaluer la fiabilité de la méthode choisie.

Le pH de la phase mobile est considéré comme le facteur le plus important, qu'il faut optimiser en premier. Cette méthode consiste à faire varier le pourcentage de l'acétonitrile pour chaque valeur du pH.

- **Facteur de capacité k'**

Le premier paramètre étudié est le facteur de capacité de dexchlorphéniramine. La figure 13 exprime la variation de k' en fonction de pourcentage d'ACN pour différentes valeurs du pH.

Dans une séparation chromatographique, il est souhaitable que la valeur de k' soit comprise entre 2 (pour que le pic soit élué après le temps mort) et 5 (pour éviter un temps d'analyse trop long et un élargissement du pic).

Nous avons étudié l'influence du pourcentage d'ACN de la phase mobile sur la rétention de DCP après avoir fixé le pH. Nous présentons les résultats dans la Figure 13.

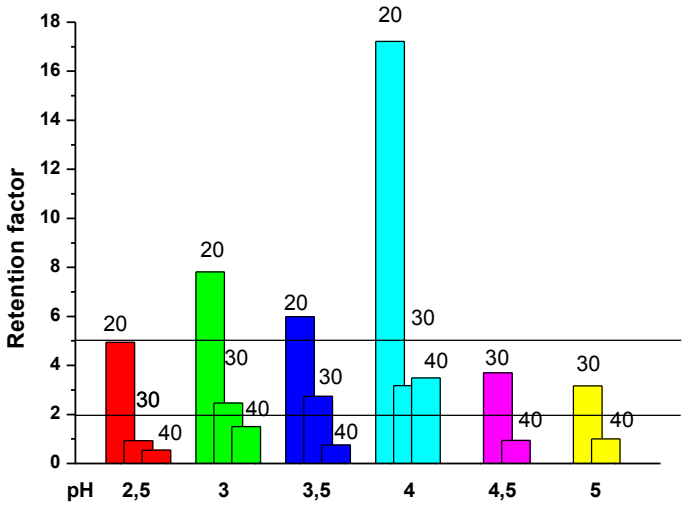


Figure 13. *Histogrammes de l'influence du pH et du % d'ACN sur la rétention du pic.*

Lorsque le pH est supérieur à 4 et pour une composition de 20% en ACN, les facteurs de rétention augmentent beaucoup et les temps de rétention deviennent supérieurs à 25 minutes. Pour cette raison, ils ne sont pas indiqués sur les histogrammes.

La figure 13 met en évidence, qu'une diminution du pourcentage d'ACN dans la phase mobile se traduit, comme attendu, par une augmentation de temps de rétention de la DCP.

Ainsi, un pourcentage en ACN de 30 % donne les meilleurs résultats, avec cependant une élution un peu rapide de la dexchlorphéniramine.

- **Nombre de plateaux théorique**

L'efficacité de la colonne, exprimée en Nombre de plateaux théorique (N), a été déterminée en modifiant le pH et la proportion d'acétonitrile dans l'éluant. La figure 14 illustre la variation de N en fonction du pH et du % d'ACN.

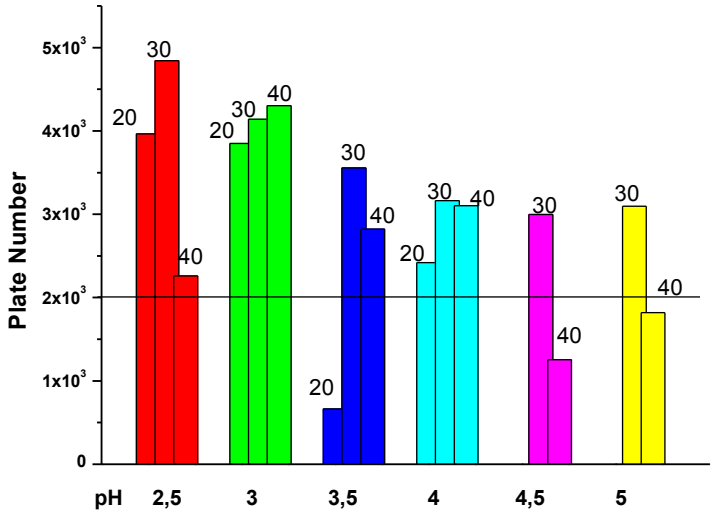


Figure 14. *Histogrammes de l'influence du pH et du % d'ACN sur le Nombre de plateaux théoriques.*

Il apparait que l'efficacité est grande pour un pourcentage de 30 % pour les valeurs de pH comprises entre 2,5 et 3.

- **Facteur de trainée**

L'étude de l'évolution du T_f en fonction du pH de la phase mobile montre que ce dernier ne varie pas de façon importante pour des valeurs de pH comprises entre 2,5 et 3 (figure 15). Cependant, l'augmentation de rétention entraîne un élargissement du pic de composé retenu.

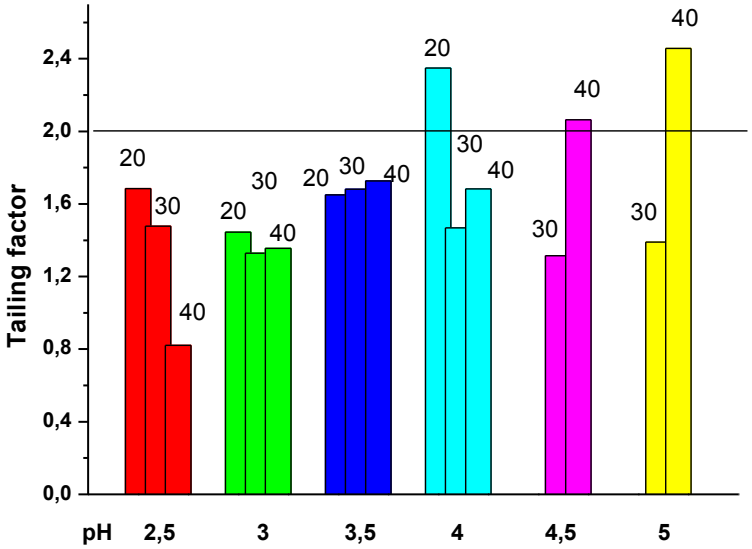


Figure 15. *Histogrammes de l'influence du pH et du % d'ACN sur la trainée du pic.*

Le SST « System Suitability Test » détaille des limites prévues pour les paramètres de validation des méthodes chromatographiques qui sont : N > 2000 ; $T_f \leq 2$ et K'> 2.

Il apparait que l'efficacité de la colonne est maximale pour un pourcentage de ***30%*** d'acétonitrile et un **pH 3**, cette même phase mobile donne le facteur de trainée le plus faible, de plus le temps de rétention comme le facteur de rétention ont des valeurs acceptables.

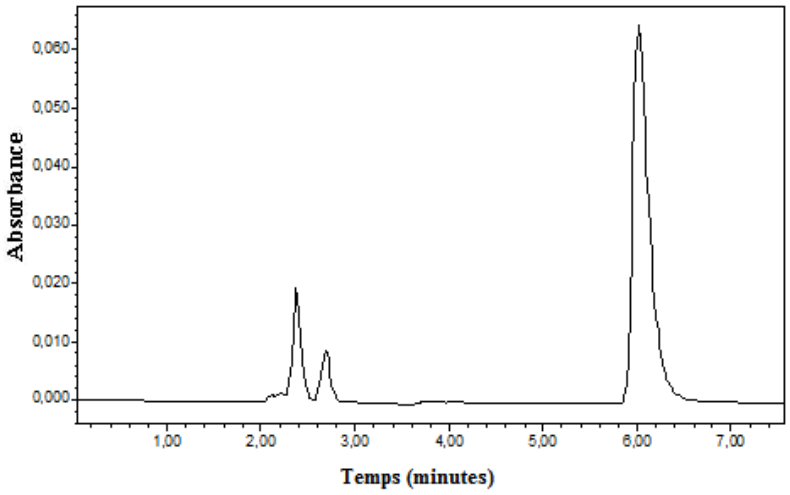


Figure 16. *Chromatogramme obtenu aux conditions choisies.*

Les résultats des calculs du test de conformité, rapportés dans le tableau 13, ont indiqué que le système chromatographique était adapté à l'analyse du maléate de dexchlorphéniramine.

Tableau 13. ***Résultats du test de conformité.***

Paramètre	*DCP*
- **Nombre de plateaux théoriques (N)**	4140,992
- **Facteur de capacité (k')**	2,46
- **Facteur de traîné (T_f)**	1,32

Ces conditions chromatographiques (30% d'ACN / 70% du tampon phosphate à pH 3 ; 50mM) ont été retenues pour la suite de notre travail. La méthode a été appliquée, après validation, pour doser la dexchlorphéniramine dans le comprimé d'une spécialité pharmaceutique.

V-2-1-2 validation de la méthode analytique

Nous avons vérifié les critères habituels de validation qui sont : la linéarité, la spécificité, la fidélité, l'exactitude, la limite de détection, la limite de quantification et la robustesse. En plus de ces critères, nous avons réalisé une épreuve de stabilité pour juger des possibilités de conservation des solutions de dexchlorphéniramine.

V-2-1-2-1 Spécificité 1

L'examen visuel des chromatogrammes relatifs au placébo (figure 17) et au principe actif (figure 16) à une longueur d'onde de 261 nm, montre l'absence de pic au temps de rétention de dexchlorphéniramine (6 min).

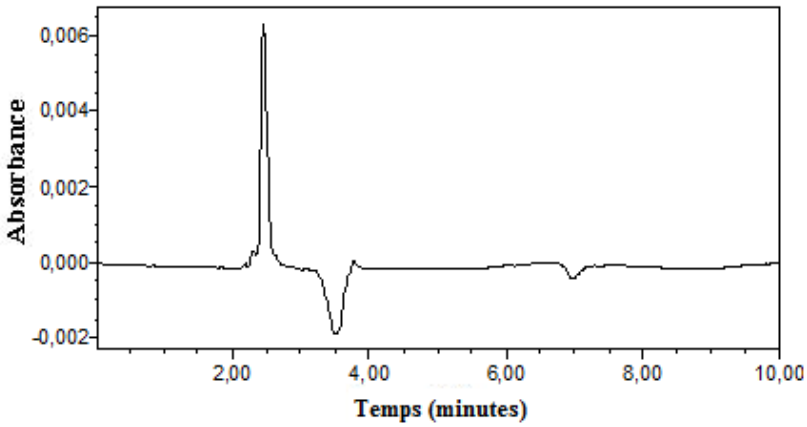


Figure 17. *Chromatogramme obtenu avec le placebo.*

La spécificité est jugée satisfaisante puisque les profils chromatographiques n'ont révélé aucune interférence entre la dexchlorphéniramine et les autres constituants de la formulation. La méthode est donc spécifique.

V-2-1-2-2 Linéarité

La linéarité de la méthode est vérifiée sur cinq points de la gamme d'étalonnage dans le domaine de concentrations allant de 20-60 mg/L en DCP (figure 18).

La droite de régression exprimant les surfaces de dexchlorphéniramine en fonction de la concentration (figure 18) est établie sur cinq points de gamme (chaque point de la gamme est une moyenne issue d'une série de cinq valeurs).

a)- Détermination de la droite de régression et calcul de ses paramètres

La première étape consiste à déterminer, en utilisant la méthode des moindres carrés, la droite de régression ajustée au plus près des mesures effectuées. Celle-ci aura pour fonction :

$$y = a + bx$$

- y : est la surface du pic de DCP.
- x : est la prise d'essai, exprimée en % de DCP.
- b : est la pente de la droite de régression.
- a : représente l'intersection de la droite de régression avec l'axe des ordonnées.

L'équation de la droite est $y = -85875 + 9368{,}12\ x$

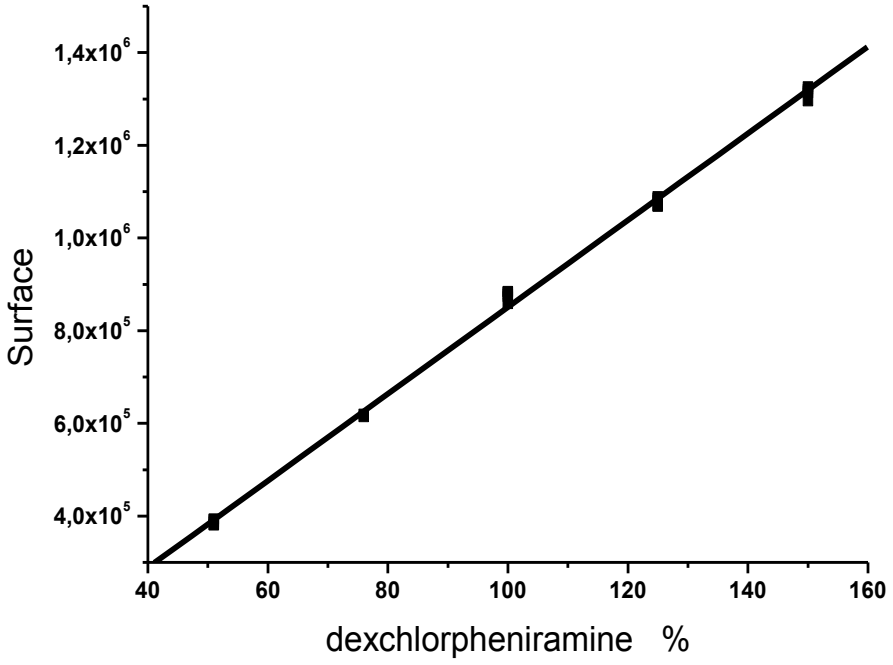


Figure 18. *Courbe d'étalonnage.*

Pour vérifier la linéarité de la méthode, le coefficient de corrélation, la pente moyenne et l'ordonnée à l'origine ont été déterminés pour les essais intra-journaliers pour la dexchlorphéniramine. Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 14. *Paramètres de la courbe d'étalonnage.*

Domaine de linéarité ($mg.L^{-1}$)	**20-60**
Pente	9368,12 ± 86,83
Ordonnée à l'origine	– 85875 ± 9230,64
Coefficient de corrélation r^2	0,999

Le coefficient de corrélation (r^2=0.999) voisin de l'unité suggère une excellente linéarité de la réponse du détecteur dans la gamme de concentration analysée.

b)- Calcul du biais

Les concentrations des standards de validation ont été calculées à partir de la courbe obtenue, ce qui a permis d'obtenir pour chaque niveau de concentration le biais relatif moyen, les limites de tolérance supérieures et inférieures des valeurs attendues au niveau.

Bj : exprime le pourcentage du rapport des concentrations calculées et les valeurs théoriques des concentrations, il est donné par la relation suivante :

$$B_j = \frac{X'_j}{X_j} \times 100$$

$$\begin{cases} X'_j : \text{Valeurs calculées.} \\ X_j : \text{Valeurs théoriques.} \end{cases}$$

Le biais moyen : $$\overline{B} = \frac{\sum_j B_j}{N}$$

Les résultats obtenus lors de l'étude de la linéarité sont regroupés dans le tableau 15.

Tableau 15. *Résultats de l'étude de la linéarité.*

% C théorique	% C expérimentale	Surface y_i (y)	% C corrigée $X'_i(y)$	Biais B_j (y)
50	51	387202	50,49	99,01
		380601	49,79	97,63
		393307	51,15	100,29
		381358	49,87	97,79
		391864	50,99	99,99
75	76	614019	74,71	98,30
		619675	75,31	99,09
		619486	75,29	99,07
		619805	75,32	99,11
		619805	75,32	99,11
100	100	858049	100,75	100,75
		883052	103,42	103,42
		873183	102,37	102,37
		878963	102,99	102,99
		884152	103,54	103,54
125	125	1,08543E6	125,03	100,02
		1,08085E6	124,54	99,63
		1,08884E6	125,39	100,31
		1,0686E6	123,23	98,58
		1,06786E6	123,15	98,52
150	150	1,32565E6	150,67	100,44
		1,3202E6	150,09	100,06
		1,3168E6	149,72	99,81
		1,2958E6	147,48	98,32
		1,31256E6	149,27	99,51
La moyenne du biais				**99,91**

Le biais moyen pour la dexchlorphéniramine est de 99,91 %, cette valeur appartient à l'intervalle [98-100,5%] préconisé par la pharmacopée donc, l'usage d'une seule solution de référence est par conséquent suffisant pour les analyses en routine.

V-2-1-2-3 Spécificité (2)

En ce qui concerne la quantification, la spécificité de la méthode consiste à s'assurer que la molécule présente des caractéristiques chromatographiques identiques qu'elle soit seule ou en présence d'autres analytes. Elle est estimée lors de la comparaison des droites obtenues avec la matrice reconstituée et celles obtenues pour le produit pur (figure 19).

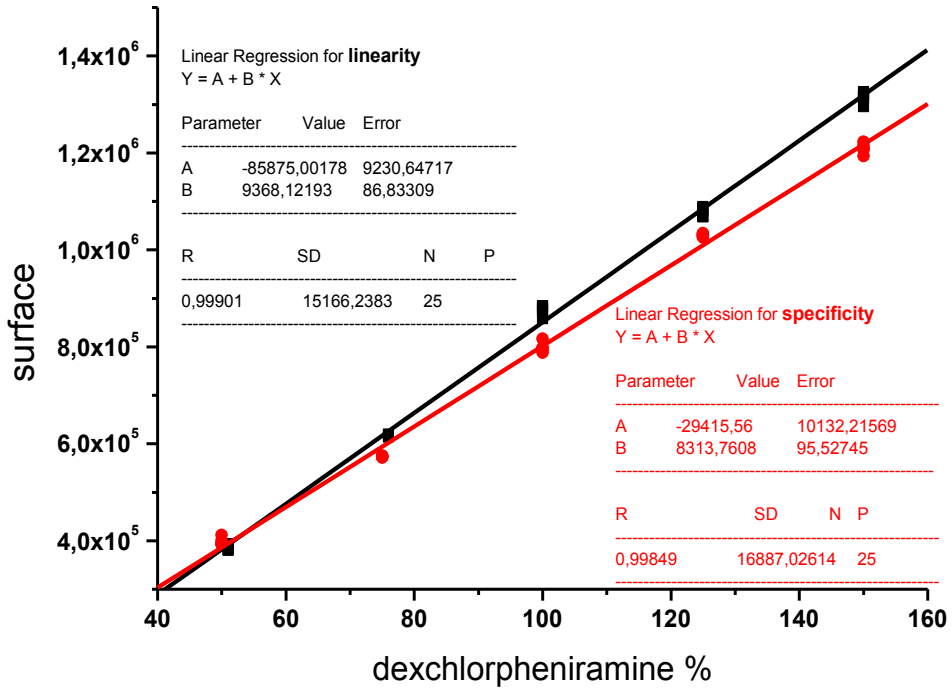


Figure 19. *Spécificité de la méthode de dosage de DCP.*

D'après la figure 19, nous remarquons que les deux droites sont presque superposables ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'interférence d'excipients (r^2= 0,998). La méthode utilisée est bien spécifique.

V-2-1-2-4 Fidélité

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. Elle a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en validation.

- La répétabilité étudie les variations très faibles entre les mesures d'un même échantillon durant un intervalle du temps très court, par exemple une journée.
- La fidélité intermédiaire représente les variations obtenues lorsque les analyses sont faites sur des jours différents mais dans un même laboratoire.

La fidélité s'est déroulée sur deux jours, avec deux manipulateurs, sur quatre solutions d'un seul niveau de concentration (solution à 100%) répétés deux fois (tableau 16).

Tableau 16. *Résultats d'étude de la fidélité de DCP dans le comprimé.*

	Surface de dexchlorphéniramine			
Série 1 manipulateur 1	772909	761738	770031	760832
Série 2 manipulateur 1	781270	768372	769840	768878
Série 1 manipulateur 2	763929	765909	770869	759076
Série 2 manipulateur 2	772371	770925	769896	769816

Les résultats obtenus après transformation des aires des pics en concentrations à partir de la courbe d'étalonnage, sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17. *Pourcentage de concentrations calculées.*

	Concentrations de dexchlorphéniramine			
Série 1 manipulateur 1	100,42	98,87	100,02	98,74
Série 2 manipulateur 1	101,58	99,79	99,99	99,86
Série 1 manipulateur 2	99,17	99,45	100,14	98,50
Série 2 manipulateur 2	100,34	100,14	100,00	99,99
Moyenne	**99,81**			

La relation utilisée pour transférer la surface de dexchlorphéniramine en concentration est :

$$[DCP]calculée = \frac{Surface - coefficient \text{ à } l'origine\ de\ la\ courbe\ d'étalonnage}{pente}$$

Le tableau suivant résume les calculs des coefficients de variation de répétabilité (variations intra-jour) et de fidélité intermédiaire (variations inter-jour).

Tableau 18. *Variations intra-jour et inter-jour de la fidélité.*

RSD intra-jour	**RSD inter-jour**	**RSD total**
0,79	0,62	0,49
≤ 2%		

Comme le montre dans le tableau 18, le coefficient de variation de répétabilité qui reflète la fidélité intra-jour pour chaque niveau de concentration ne dépasse pas 0,8 %.

Pour la fidélité intermédiaire qui reflète la fidélité inter-jour, le coefficient de variation ne dépasse pas 0,62 %, ce qui montre que la méthode est fidèle.

D'autre part, il faut noter que nous n'avons pas trouvé de différence marquante entre la répétabilité et la fidélité intermédiaire, ce qui montre que les conditions de dosage influent peu sur les résultats observés.

V-2-1-2-5 Exactitude

L'exactitude fournit une indication sur les erreurs systématiques. Elle est calculée à partir des résultats de la fidélité et présente l'écart du pourcentage de récupération par rapport à 100 %.

Le pourcentage de récupération est calculé comme suit :

$$PR = 100 \times \frac{Ym}{valeur\ de\ référence}$$

Y_m : valeur moyenne de tous les résultats (de Y').

Y' : la moyenne de chaque série

PR : pourcentage de récupération.

Tableau 19. *Résultats d'étude de l'exactitude de DCP*

	Valeur de référence	**Yi**			
Série 1 manipulateur 1	100	100,42	98,87	100,02	98,74
Série 2 manipulateur 1	100	101,58	99,79	99,99	99,86
Série 1 manipulateur 2	100	99,17	99,45	100,13	98,50
Série 2 manipulateur 2	100	100,34	100,14	100,00	99,99

.

$$\mathrm{LS} = \mathrm{PR} + t_{0,975} Sy/\sqrt{\mathrm{m}}$$

$$\mathrm{LI} = \mathrm{PR} - t_{0,975} Sy/\sqrt{\mathrm{m}}$$

LS : limite supérieure

LI : limite inférieure

$t_{0.975}$ = coefficient de Student = 3.182 pour un intervalle de confiance à 95% et m=4

Tableau 20. *Ecart type et moyenne des résultats.*

	Y'	**Y_m**	**SD**	**SD_{moy}**
Série 1 manipulateur 1	99,51	99,81	0,83	0,63
Série 2 manipulateur 1	100,30		0,85	
Série 1 manipulateur 2	99,31		0,67	
Série 2 manipulateur 2	100,12		0,16	

$$\mathrm{LI} < PR < LS$$

$$\text{Précision} = 100 - \mathrm{PR}$$

LI	**PR**	**LS**	**Exactitude**
99,31	99,81	100,31	0,18

Comme le PR est bien compris entre les deux limites et la valeur de la précision n'excède pas les 2% alors on peut conclure que notre méthode d'analyse est exacte.

V-2-1-2-6 Limite de détection & Limite de quantification

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées pour la DCP afin d'apprécier la sensibilité de la méthode.

La limite de détection (LOD) a été déterminée en considérant un rapport signal/bruit de 3. Dans ces conditions, nous avons obtenu une valeur de limite de détection égale à ***0,29 µg/mL***.
La limite de quantification (LOQ) se définissant comme étant égale à 10* bruit de fond (3,3 fois la limite de détection), nous avons obtenu pour la DCP une limite de quantification voisine de ***1 µg/mL***.

Cette valeur de limite de quantification a été retenue pour correspondre au premier point de la gamme d'étalonnage.

V-2-1-2-7 Robustesse

La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, délibérées, de facteurs associés à la procédure. Ce caractère permet d'appliquer la méthode analytique sous différentes conditions (pH, débit,λ etc.) et donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application.

V-2-1-2-7-1 Variation du pH

Nous avons fixé la valeur du pH à 2,9 ; 3 et 3,1, sans modification des autres paramètres, et effectué l'analyse. Comme montre le tableau 21, les coefficients de variation relatifs aux temps de rétention et la surface restent dans les normes (CV≤ 2%).

Tableau 21. *Variation du pH.*

	pH 2,9		**pH 3**		**pH 3,1**	
	Surface	**Tr**	**Surface**	**Tr**	**Surface**	**tr**
Moyen	794261,6	5,86	789734	6,04	757714,8	6,35
SD	6886,43	0,02	12607,77	0,07	2327,12	0,02
CV	**0,86**	**0,50**	**1,59**	**1,29**	**0,30**	**0,30**

Le profil chromatographique obtenu dans ces conditions montre que le temps de rétention de la dexchlorphéniramine varie peu (figure 20).

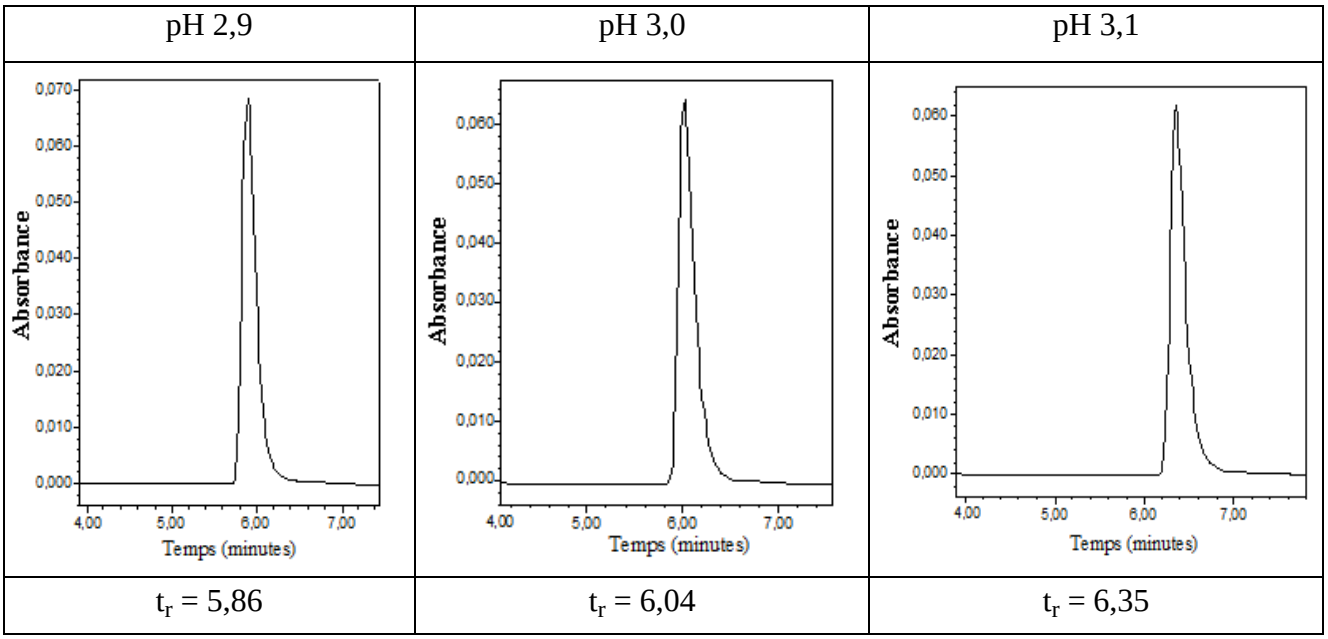


Figure 20. *Chromatogrammes de variation du pH.*

V-2-1-2-7-2 Variation du débit

L'efficacité de la colonne est directement liée au débit de la phase mobile. Il est donc préférable de travailler à un débit égal ou supérieur au débit optimal, de manière à garder le HEPT le plus petit possible et donc garantir un maximum d'efficacité.

Nous avons fixé la valeur du débit à 0,9 ; 1 et 1,1, sans modification des autres paramètres. Les résultats sont reportés dans le tableau 22.

Tableau 22. *Variation du débit.*

	débit 0,9		**débit 1**		**débit 1,1**	
	Surface	**Tr**	**Surface**	**Tr**	**Surface**	**Tr**
Moyen	852992,2	6,65	789734	6,04	717534,8	4,76
SD	3353,31	0,04	12607,77	0,07	5818,92	0,006
CV	**0,39**	**0,63**	**1,59**	**1,29**	**0,81**	**0,12**

Les coefficients de variation des temps de rétention et des surfaces sont inférieurs à 2 %, ce qui veut dire que les résultats sont satisfaisants.

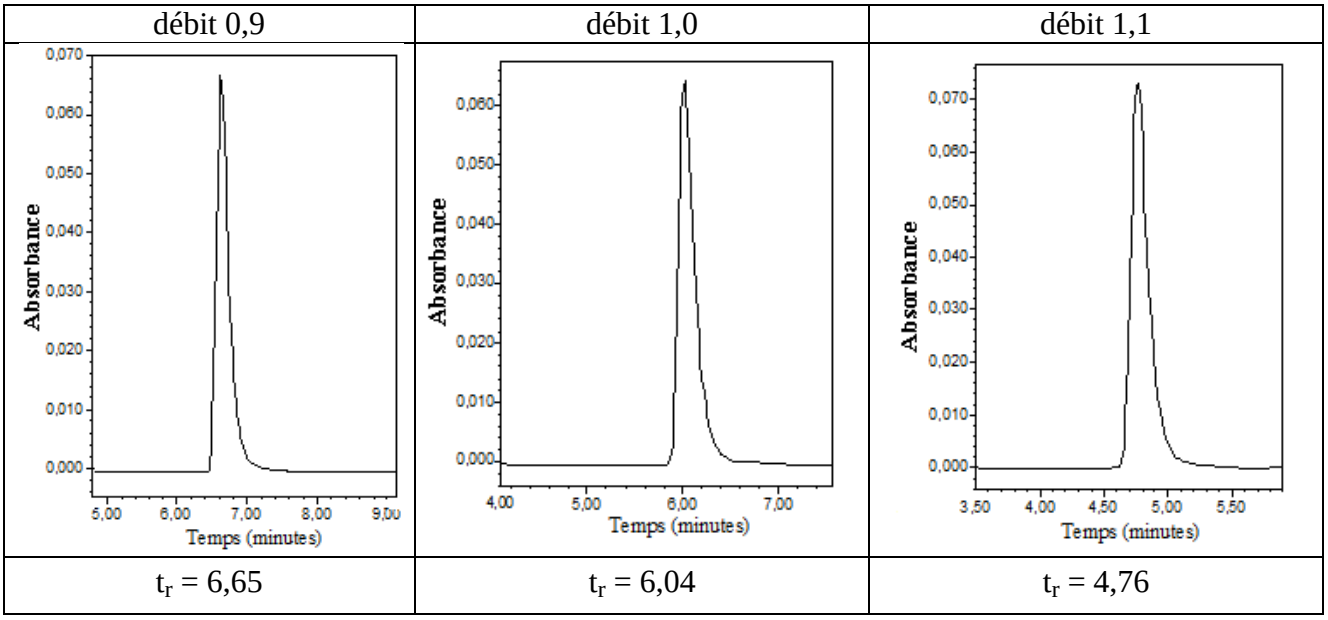


Figure 21. *Chromatogrammes de variation du débit.*

Nous avons remarqué que le débit de la phase mobile peut influencer sur le temps de rétention, mais cette variation reste dans les normes.

V-2-1-2-7-3 Variation de la longueur d'onde

Après modification de la longueur d'onde à trois valeurs (259 ; 261 et 263), sans modification des autres paramètres, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 23.

Tableau 23. *Variation de la longueur d'onde.*

	λ= 259 nm	**λ= 261 nm**	**λ= 263 nm**
Surface Moyenne	738374,2	789734	809754,6
SD	9637,45	12607,77	10391,51
CV	**1,30**	**1,59**	**1,28**

Les CV des surfaces obtenues dans les conditions précédemment prescrites sont dans les normes exigées.

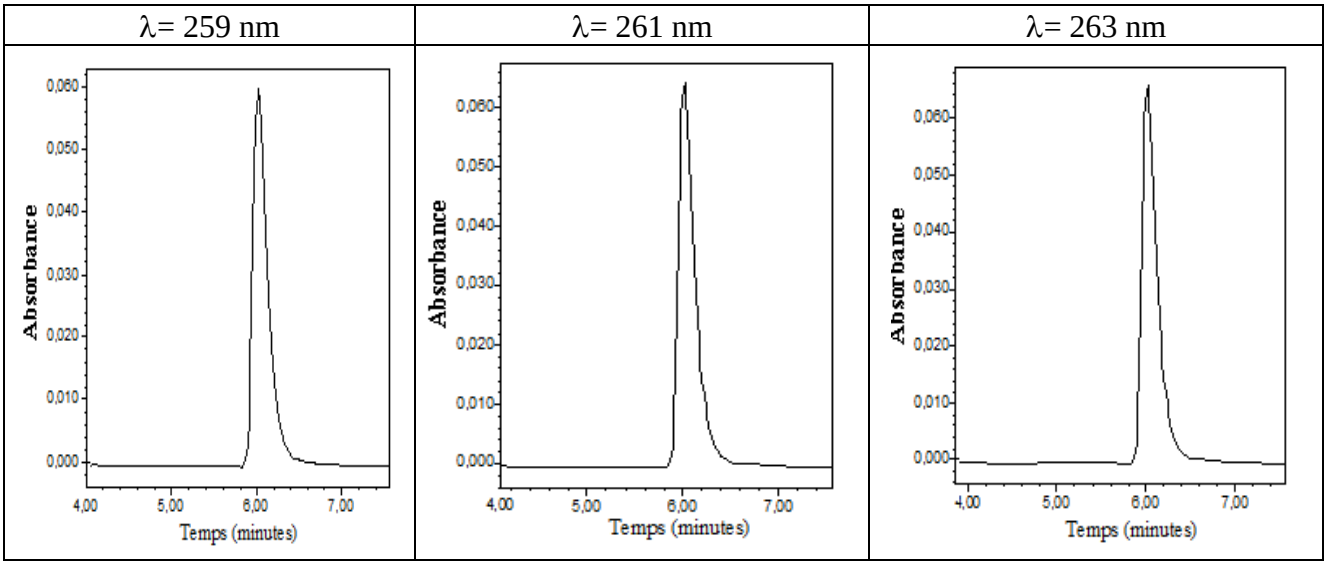


Figure 22. *Chromatogrammes de variation de la longueur d'onde.*

Après toutes ces modifications, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant

	Temps de rétention	Surfaces
SD	1,13	0,46
RSD_{total}	**1,31**	**1,32**

D'après ces résultats, les coefficients de variation intra-jours restent dans les normes (inférieur à 2%), ce qui vérifie la robustesse de la méthode développée.

V-2-1-2-8 Stabilité

Le but des essais de stabilité est de fournir des informations destinées à définir la période pendant laquelle les solutions étalons se sont avérées stables.

La solution étalon à 100 % en DCP utilisée lors de l'étude de la linéarité est divisée en deux. La première moitié a été maintenue à 4°C, La seconde à température ambiante.

La stabilité est déterminée comme étant le rapport entre le résultat obtenu en un temps T et le résultat obtenu au temps initial T_0 selon la formule suivante.

$$R = \frac{\text{Résultat moyen obtenu au temps t}}{\text{Résultat moyen obtenu au temps to}} \times 100$$

Les résultats de l'étude de la stabilité ont été reportés dans le tableau 24.

Tableau 24. *Stabilité des solutions préparées.*

	Temps	**Surface$_{moy}$ de DCP**	**% de DCP**
Température	Jour 0	810288	100,00
25°C	Jour 1	790669,4	97,57
	Jour 2	787388,6	97,17
	Jour 3	755456,0	93,23
4°C	Jour 1	829600,6	102,38
	Jour 2	811860,4	100,19
	Jour 3	794778,2	98,08
	Jour 4	756882,6	93,40

On observe une baisse modérée des concentrations, qui devient significative après le 3ème jour à 25 °C.

Au vu de la norme retenu par l'ICH (2,5 %), il apparait que la solution est stable pendant 3 jours à 4°C et 2 jours à 25°C.

V-3 Partie III : Dosage de la dexchlorphéniramine dans le Plasma

L'analyse d'un produit dans une matrice complexe telle que le sang nécessite la présence d'une étape de purification, permettant d'éliminer les interférences possibles dues aux substances endogènes. L'objectif de ce travail est de mettre au point une méthode de dosage facilement transposable en routine [78].

Nous avons choisi d'utiliser parmi les systèmes les plus performants celui qui était le plus facile à mettre en œuvre, à savoir la CPG/ SM.

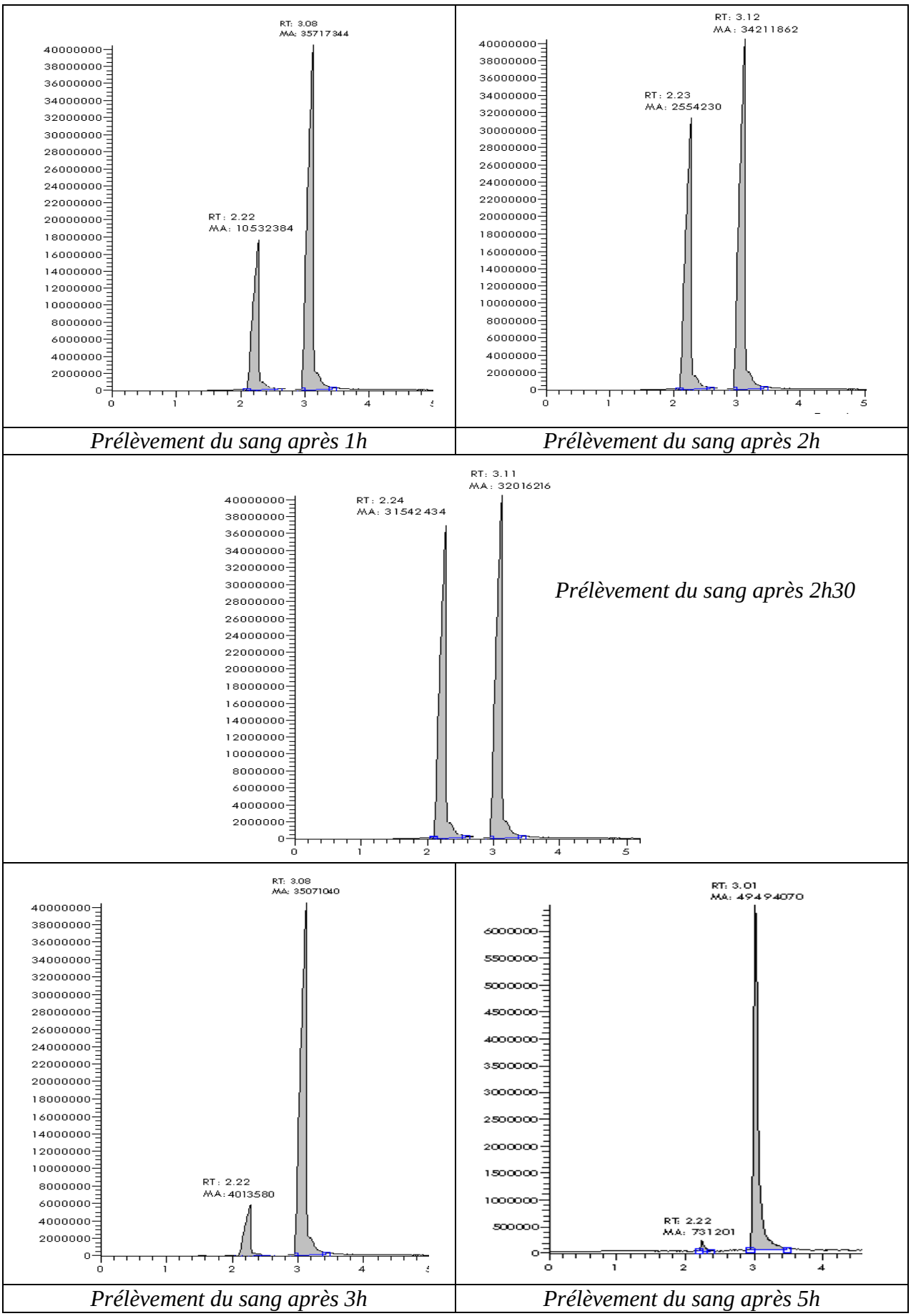
V-3-1 Choix de l'étalon interne

Notre choix s'est porté sur la bromphéniramine comme étalon interne car elle n'interfère pas avec le pic de la dexchlorphéniramine. Cette molécule fait partie de la même famille chimique que la molécule d'intérêt du point de vu de sa structure, de sa stabilité thermique et de son comportement vis-à-vis de l'étape de LLE.

V-3-2 Analyse chromatographique des extraits plasmatiques

Les profils chromatographiques présentés dans la figure 23 illustrent l'absence d'interférences au niveau des pics correspondant à la dexchlorphéniramine et à l'étalon interne. La méthode de purification choisie est satisfaisante pour doser la molécule étudiée.

L'analyse des chromatogrammes obtenus a mis en évidence des temps de rétention satisfaisants puisque les composés sont élués dans un temps d'analyse totale de moins de quatre minutes.



Prélèvement du sang après 1h | *Prélèvement du sang après 2h*

Prélèvement du sang après 3h | *Prélèvement du sang après 5h*

Figure 23. *Profils chromatographiques représentatifs des extraits plasmatiques.*

L'identification de ces pics est effectuée en se basant sur l'interprétation des spectres de masses correspondants avec les données rapportées dans la littérature ainsi qu'avec le spectre de la librairie de la CPG/ SM (figures 24).

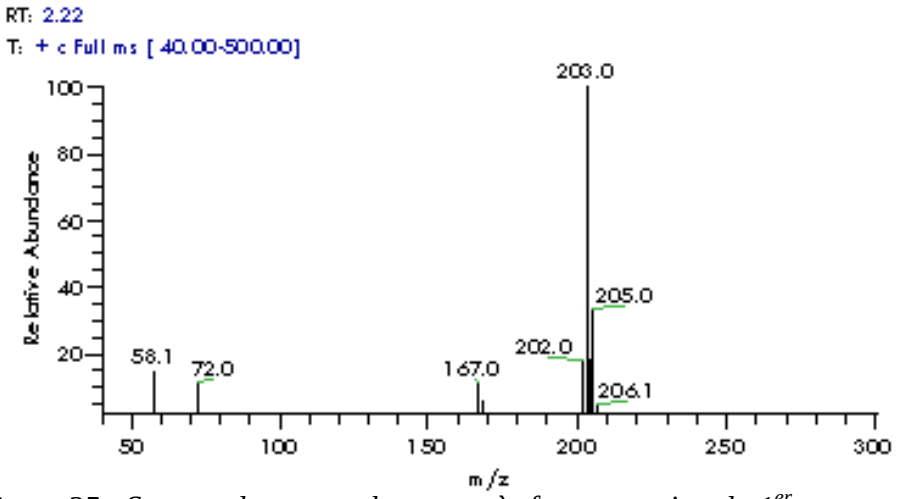


Figure 25. *Spectre de masse obtenu après fragmentation du 1er composé.*

L'analyse spectrométrique de masse, ne montre pas le pic moléculaire M^+ qui confirme la formule brute attendue dans chaque cas, mais on distingue nettement la présence de pics de fragmentation caractéristiques.

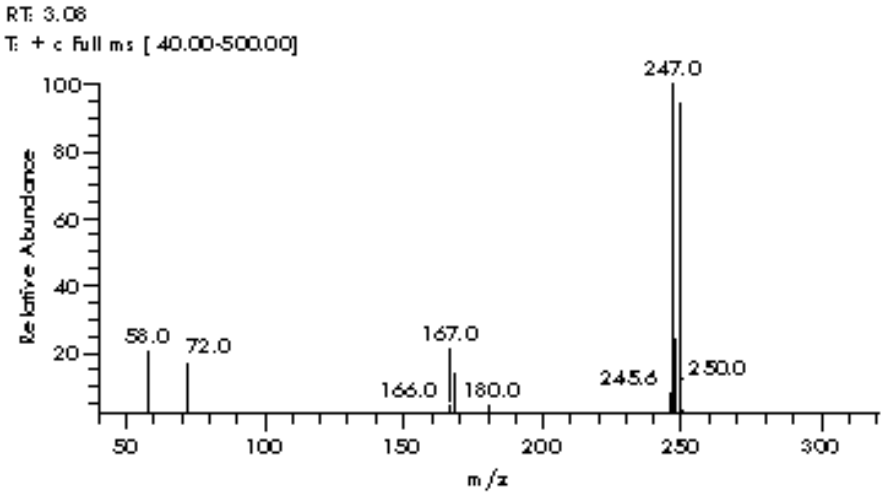


Figure 26. *Spectre de masse obtenu après fragmentation du 2ème composé.*

Les analyses de masse ont mis en évidence que les ions moléculaires initialement formés sont instables et qu'ils fragmentent déjà dans la source avant d'atteindre le détecteur.

Le pic élué à 2,22 minutes présente les ions m/z suivants : 205, 203, 202, 167, 72 et 58. Le pic élué à 3,08 minutes est identifiable par ses ions caractéristiques m/z : 247, 250, 167, 166 et 72, 58. Les spectres de masse (figures 25 et 26), montrent la présence des pics de base correspondants, de m/z = 203 et m/z = 247, et les pics isotopiques correspondants (m/z = 205 et m/z = 249).

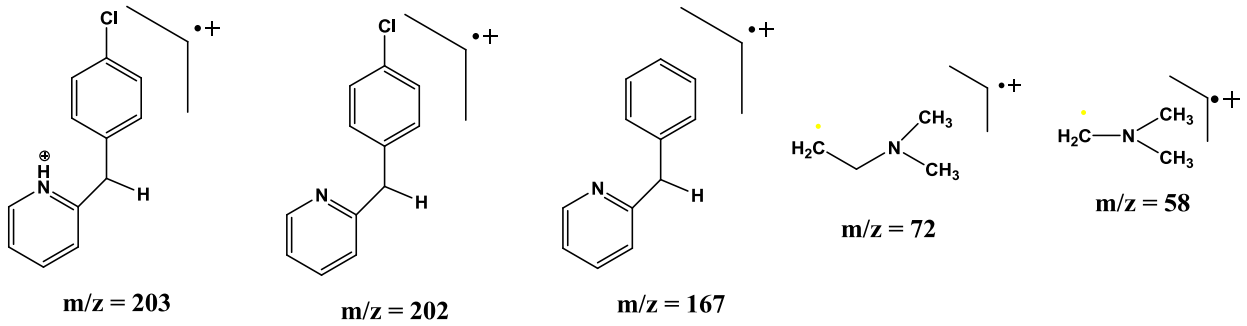


Figure 27. *Les principaux ions du spectre de masse du 1er composé.*

Par ailleurs, le spectre de masse obtenu par la fragmentation du 1er composé élué est en accord avec les données présentées dans la librairie de la CPG/ SM et dans la littérature.

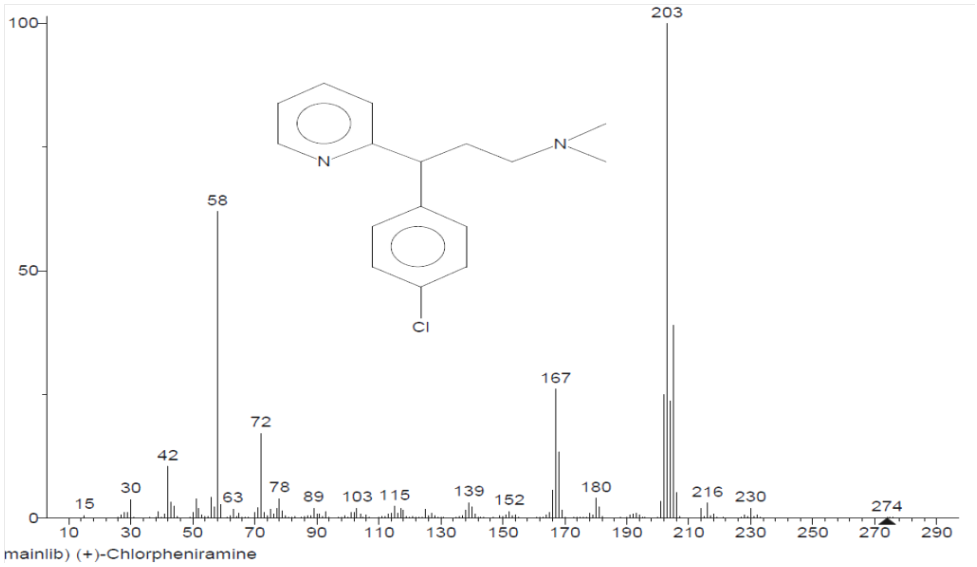
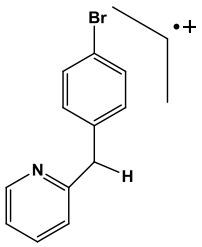


Figure 24. *Spectre de masse de référence de la dexchlorphéniramine.*

Nous avons confirmé que le pic qui a été élué à un temps de 2,22 min correspond à celui de la dexchlorphéniramine. Le spectre de masse représenté dans la figure 24, d'où le pic de base m/z = 247 est attribué à la bromphéniramine (EI) qui possède les mêmes fragments que la DCP.



m/z = 247

V-3-3 Evolution de la biodisponibilité in vivo

Cette méthode analytique a été utilisée avec succès dans le cadre d'une étude pharmacologique investiguant la cinétique de la dexchlorphéniramine dans le sang.

Une dose unique par voie intra-péritonéale (0,1 mg/mL) de dexchlorphéniramine a été administrée à des rats femelles dont le poids moyen est 250 g. Des prélèvements sanguins ont été effectués sur un intervalle de temps précis, afin de quantifier la DCP dans le plasma.

Les concentrations plasmatiques de la dexchlorphéniramine ont été déterminées par la méthode de l'étalonnage interne. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 28.

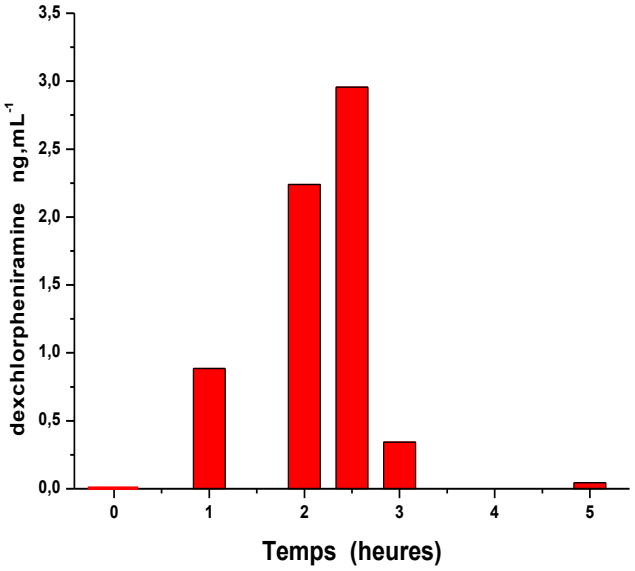


Figure 28. *Evolution des concentrations plasmatiques de DCP en fonction du temps.*

Le modèle pharmacocinétique de la dexchlorphéniramine (figure 28) permet de prédire la phase d'absorption de la dexchlorphéniramine et les paramètres pharmacocinétiques qui les caractérisent (C_{max} et t_{max}).

La biodisponibilité se définit comme étant la fraction de la dose de médicament administré qui atteint la circulation générale et la vitesse à laquelle elle l'atteint.

Le pic plasmatique est atteint à t_{max} égal à *2 h 30* où la concentration plasmatique maximale est de *3 ng/ml* valeur indiquée dans la littérature, ce qui montre une adéquation de la méthode analytique pour les études de la biodisponibilité.

La cinétique montre un pic plasmatique à environ 2 heures et 30 minutes, puis une baisse rapide des concentrations durant une demi-heure suivie d'une diminution lente entre 3 et 4 heures. La figure 28 illustre la cinétique plasmatique issue de cette administration.

Conclusion

Générale

Dans ce travail, nous rapportons l'apport de la CPG, de l'HPLC et de la CPG/SM dans le dosage du maléate de dexchlorphéniramine (matière première, produit fini et le plasma).

Nous avons tout d'abord vérifié la qualité de la matière première utilisée. Plusieurs tests physico-chimiques ont été effectués dans le but d'identifier et de quantifier le principe actif. A ce stade, l'HPLC intervient dans la détermination de la pureté énantiomérique de la matière première ; la CPG dans la détermination des substances apparentées. La DCM utilisée a été conforme aux normes de la monographie.

L'essai de dissolution est destiné à déterminer l'aptitude d'une forme galénique à laisser passer en solution, dans un milieu déterminé, le principe actif qu'elle contient. Le test de dissolution des comprimés a donné les taux de dexchlorphéniramine de 82,5 ; 87,5 et 88,2 % suivant les lots analysés par CPG en utilisant la bromphéniramine comme étalon interne. Ces valeurs sont en accord avec les normes préconisées par la pharmacopée américaine.

Dans le cas du produit fini, la DCM a été quantifiée par HPLC. La colonne utilisée est une silice greffée Ascentis C8 ; 250 mm x 4.6mm. La phase mobile retenue est constituée d'un mélange de l'acétonitrile et d'une solution tampon phosphate 0.05M à pH 3 (30/70, v/v). La détection a été réalisée par UV à 261 nm.

Les différents paramètres de conformité ont été appliqués pour apprécier l'applicabilité de la méthode proposée. Les résultats ont indiqué que le système chromatographique retenu est adapté à l'analyse de DCP dans les comprimés puisque le nombre de plateaux théoriques est acceptable ($N > 4000$), et les valeurs des facteurs de capacité et de trainé sont satisfaisantes ($K' = 2,46$ et $T_f = 1,32$).

L'étude de la linéarité a permis de définir des domaines allant de 20 à 60 mg/L. Le coefficient de régression obtenus était hautement significatif ($r^2 = 0,999$).

Le biais moyen est de 99,91%, ce qui permet l'utilisation d'une seule solution de référence pour l'analyse en routine. L'absence de pic interférent met en évidence la spécificité

satisfaisante de la méthode. Les coefficients de variation obtenus (RSD_{intra}=0,8 et RSD_{inter}=0,6) ainsi que le pourcentage de récupération (PR=99,81) conformes aux normes, évaluant respectivement la fidélité et l'exactitude sont satisfaisants.

Concernant les paramètres facultatifs de la validation, la mesure de la robustesse a été réalisée sur des faibles variations du pH et du débit de la phase mobile ainsi que de la longueur d'onde à laquelle a été mesurée l'absorption de la phase mobile. Des résultats satisfaisants ont été obtenus. La stabilité des solutions préparées a été mesurée à température ambiante et à 4°C. Les solutions se sont révélées stables respectivement pendant 2 et 3 jours.

Sur le plan de la sensibilité, notre méthode présente une limite de détection (0,29 µg/mL). Dans ces conditions, notre limite de quantification (1 µg/mL).

L'ensemble des résultats des essais de validation appliqués indique que la méthode retenue semble bien adaptée à la détermination du maléate de dexchlorphéniramine dans les comprimés.

La biodisponibilité de dexchlorphéniramine chez le rat après administration d'une dose unique (0,1mg/mL), par voie intra péritonéale a été évaluée par CPG/SM en réalisant des prélèvements sanguins à des temps précis. Les paramètres pharmacocinétiques comme le t_{max} et la C_{max} ont été déterminés.

Références

Bibliographiques

[1]. Aïache. J M, Beyssac. E, Cardot. J M, Hoffart. V, Renoux. R «*Initiation à la connaissance du médicament*» 2008 Elsevier Masson p312.

[2]. ABELLI. C, ANDRIOLLO. O, MACHURON. L, VIDEAU. J.Y, VENNAT. B, POUGET. MP «*Equivalence Pharmacologique des Médicaments Essentiels Génériques*» STP PHARMA PRATIQUES 11 (2) 2001 p 89.

[3]. ANTOGNINI G «*Les génériques*». Journal Suisse de la Pharmacie, 1987, N°14 p 386.

[4]. Aïache. J M, Beyssac. E, Cardot. J-M, Hoffart. V, Renoux. R «*Initiation à la connaissance du médicament*» 5 ème Edition Masson 2008 p 53.

[5]. Duchateau. J, Heenen. M, Sternon. J. «*Les Antihistaminiques H_1 Antagonists of H_1 histamine*» Rev Med Brux 2003 p 96.

[6]. Charles R. Craig Robert E. Stitzel. **«***Modern Pharmacology With Clinical Applications*» 5è edition p 453.

[7]. Rama Rao Nadendla «*Principles of Organic Medicinal Chemistry*» 2005, New Age International p 187; 188; 196; 197.

[8]. Piette. V, Demoly. P «*L'usage des antihistaminiques H_1 en cours de grossesse*» La lettre du pneumologue vol VIII-N°2 mars-avril *2005*.

[9]. LÉONARD. L, BEN AMAR. M «*Les psychotropes : Pharmacologie et toxicomanie*» 1994 p210.

[10]. Nilton S.Viana Jr., Ligia M. Moreira-Campos, Cristina D.Vianna-Soares «*Derivative ultraviolet spectrophotometric determination of dexchlorpheniramine maleate in tablets in presence of coloring agents*» Il Farmaco 60 (2005) 900–905.

[11]. Hee-Kyung Hong, Su-Hyun Jo «*Block of hERG K^+ Channel by Classic Histamine H_1 Receptor Antagonist Chlorpheniramine*» Korean J Physiol Pharmacol Vol 13. June 2009 p 215.

[12]. Karen M. Fried, Andrea E. Young, Sally Usdin Yasuda, Irving W. Wainer « *The enantioselective determination of chlorpheniramine and its major metabolites in human plasma using chiral chromatography on a β-cyclodextrin chiral stationary phase and mass spectrometric detection*» J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 479-488.

[13]. Eef L. Theunissen, Annemiek Vermeeren, Johannes G. Ramaekers «*Repeated-dose effects of mequitazine, cetirizine and dexchlorpheniramine on driving and psychomotor performance*» British J of Clin Pharmacolo 2005 61:1 79–86.

[14]. Nilton. S, Viana. Jr, Ligia. M, Moreira-Campos, Cristina. D, Vianna-Soares « *Derivative ultraviolet spectrophotometric determination of dexchlorpheniramine maleate in tablets in presence of coloring agents*» Il Farmaco 60 (2005) 900–905.

[15]. Monographie 01/2008:1196 du maléate de Dexchlorphéniramine PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 2008 6ème Edition.

[16]. Kazemipour. M, Ansari. M «*Derivative Spectrophotometry for Simultaneous Analysis of Chlorpheniramine Maleate, Phenylephrine HCl, and Phenylpropanolamine HCl in Ternary Mixtures and Pharmaceutical Dosage Forms*» Iranian J of Pharmaceutical Research (2005) N°3 147-153.

[17]. Chemistry Encyclopedia of pharmaceutical substances 4th edition 2000.

[18]. KIRKIACHARIAN. S **«***Chiralité et médicaments***»** Techniques de l'Ingénieur p3340 : 12

[19]. Sean C Sweetman «*Martinadale The complete Drug Reference* » BPharm, FRPharmS; thirty-sixth Edition p572, 2009.

[20]. Gerald Gübitz, Martin G. Schmid «*Chiral Separation by Chromatographic and Electromigration Techniques. A Review*» Biopharm. Drug Dispos. 22: 291–336 (2001).

[21]. Denis Stora «*Pharmacie et surveillance infirmière*» 5ème Edition 2008 LAMARRE p9.

[22]. AOUN. A «*Dictionnaire des Médicaments Saidal*» Edition 2005.

[23]. Takeshi Takagaki, Michiaki Matsuda, Yasuyuki Mizuki, Yoshiaki Terauchi «*Simple and sensitive method for the determination of chlorpheniramine maleate in human plasma using liquid chromatography–mass spectrometry*» J. Chromatogr. *B 000 (2002) 000–000.*

[24]. Celma. C, Allue. J.A, Prun˜onosa. J, Peraire. C, Obach. R «*Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*» J of Chromatogr A, 870 (2000) 77–86

[25]. Moreno RA, Oliveira-Silva D, Sverdloff CE, Borges BC, Rebelo Galvinas PA, Astigarraga RB, Borges NC «*Determination of chlorpheniramine in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS: application to a dexchlorpheniramine comparative bioavailability study*» Biomed Chromatogr. 2010 Jul; 24(7) 774-81.

[26]. Shiew-Mei Huang, Win L. Chiou «*Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Chlorpheniramine in Rabbits after Intravenous Administration*» J. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Vol. 9, N° 6, 1981.

[27]. S. M. Huang, N. K. Athanikar, K. Sridhar, Y.C. Huang , and W. L. Chiou «*Pharmacokinetics of Chlorpheniramine After Intravenous and Oral Administration in Normal Adults*» Eur J Clin Pharmacol (1982) 22:359-365.

[28]. «*Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques : Recueil de directives et autres documents* » OMS 1998. Volume1

[29]. J. Vial, A. Jardy, «*Journal of High Resolution Chromatography*» 22,(1999), 217-221.

[30]. Swarbrick. J «*Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* »Third Edition Vol 1, 2007

[31]. Autorisation de mise sur le marché des médicaments à usage humain notamment d'origine multisource (génériques) Manuel à l'usage des autorités de réglementation pharmaceutique OMS N°13.

[32]. The International Pharmacopoeia Test and general requirements for dosage forms Quality Specifications for pharmaceutical Substances and Tablets. Third Edition Vol 5; 2003.

[33]. Caporal-Gautier. J, Nivet. J.M, Algranti. P, Guilloteau. M, Histe. M, Lallier. M, N'Guyen. J.J, Russotto. R « Guide de validation analytique Rapport d'une commission SFSTP I. Méthodologie» STP PHARMA PRATIQUE 2 (4) 1992 205-226.

[34]. Y.Gomezetal. J.Pharma and Biomedica Analysis 34 (2004) 341–348.

[35]. M. Eichelbaum and A.G. Gross, Stereochemical aspects of drug and disposition in Advances in drug research, vol. 28, Academic Press Limited, Londres, Angleterre, 1996,1 – 64.

[36]. U.S. PHARMACOPEIA USP33-NF28 2011. (231) HEAVY METALS.

[37]. BAUER .M « *Analyses des solvants résiduels dans les produits pharmaceutiques* » techniques de l'ingénieur, traité Analyse et Caractérisation p 3 260-20

[38]. BAUER. M «*Cristallisation et Plymorphisme* » Techniques de l'ingénieur AF 3 642-2.

[39]. Boulanger. B, Chapuzet. E, Chiap. P, Cohen.N, Compagnon. P.A, Dewe. W, Feinberg. M, Lallier. M, Laurentie. M, Mercier. N, Muzard. G, Nivet. C, Valat. L «*Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches*» STP PHARMA PRATIQUE. Vol 13 N°3 mai/juin 2003 p101 ; 116 ; 117.

[40]. Leonard Steinborn «*GMP/ISO Quality Audit Manual for Healthcare Manufacturers and Their Suppliers*» Regulations, Standards, and Guidelines vol 2 ; Sixth Edition CRC PRESS 2005.

[41]. Épshtein N. A. «*STRUCTURE OF CHEMICAL COMPOUNDS, METHODS OF ANALYSIS AND PROCESS CONTROL : VALIDATION OF HPLC TECHNIQUES FOR PHARMACEUTICAL ANALYSIS*» Pharmaceutical Chemistry Journal Vol. 38, No. 4, 2004 p 212-227.

[42]. Joachim Ermer, John H. McB. Miller « Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice» WILEY-VCH 2005.

[43]. R.D. McDowall , McDowall Consulting, Bromley, Kent, UK **«***Validation of chromatography data systems – Meeting business and regulatory requirements* » R.D. McDowall – Ed Royal Society of Chemistry, 2005.

[44]. J. Ermer and J. H. McB. Miller «*Method Validation in Pharmaceutical Analysis*» WILEY-VCH Verlag GmbH & Co 2005.

[45]. CHAN. C C, LAM. H, LEE. Y. C, ZHANG X-M «*ANALYTICAL METHOD VALIDATION AND INSTRUMENT PERFORMANCE VERIFICATION*» WILEY-INTERSCIENCES 2004.

[46]. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2 (R1) version 1994

[47]. Hubert. P, Nguyen-Huub. J-J, Boulanger. B, Chapuzet. E, Chiap. P, Cohenf. N, Compagnong. P-A, Dew´e. W, Feinberg. M, Lallier. M, Laurentie. M, Mercier. N, Muzardl. G, Nivetm. C, Valat. L, Rozet. E «*Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal – Part II*» J of Pharma and Biomed Analysis *45 (2007) 70–81*.

[48]. David G. Watson «*Pharmaceutical Analysis A Texbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*» CHURCHILL LIVINGSTONG 1999; p 7.

[49]. DINGEON. B, DREYFUSS. M-F, GAILLARD. Y, LE BOUIL. A, LHERMITTE. M, MAZZEGA.S, MOULSMA. M, PÉPIN. G, PERRIN. M, PLESSE. J, ROUSSEL. O, THEVENG. M-T, VINNER. É, DEVEAUX. M. Annales de Toxicologie Analytique, vol. XVN, N° 3, supplément 1, 2005 p9.

[50]. Maxwell. W, Sweeney. J «*Applying the Validation timeline to HPLC System Validation LC/GC*» Volume 12 (9), September 1994 p 678-82.

[51]. Olivier NICOLAS", Christine FARENC(2), Françoise BRESSOLLE1. Annales de Toxicologie Analytique, vol. XVI, n° 2, 2004

[52]. Kim Huynh-Ba «*Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development : Regulations, Methodologies, and Best Practices* » Springer 2009 , p115-117

[53]. ROSSET. R, CAUDE. M, JARDY. A « *Chromatographie en phase liquide et supercritiques*» MASSON 1991.

[54]. Robert L. Wixom, Charles. W, Gehrke « *CHROMATOGRAPHY A Science of Discovery*» WILEY 2010 , p3-9

[55]. Ashutosh Kar «Pharmaceutical Drug Analysis» Second Edition 2005 p 30.

[56]. Brian A. Bidlingmeyer «Practical HPLC methodology and applications» 1992.

[57]. Robert L. Grob, Ph.D, Eugene F. Barry, Ph.D «*MODERN PRACTICE OF GAS CHROMATOGRAPHY*» FOURTH EDITION WILEY-INTERSCIENCE 2004.

[58]. Rouessac. F, Rouessac. A « *ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes*» 6e édition DUNOD 2004 ; p 61.

[59]. Satinder Ahuja, Michael W. Dong «*HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS BY HPLC*» ELSEVIER ACADEMIC PRESS 2005; p 23.

[60]. Satinder Ahuja, Henrik Rasmussen«*HPLC METHOD DEVELOPMENT FOR PHARMACEUTICALS*» SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY Volume 8; p15

[61]**.** Braithwaite. A, Smith. F.J «*CHROMATOGRAPHIC METHODS*» FIFTH Edition KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS 1999; p28.

[62]. Stavros Kromidas «*Practical Problem Solving in HPLC*» WILEY-VCH 2004

[63]. Jack Cazes «*Encyclopedia of Chromatography*» 2004 Update Supplement p 5-15.

[64]. MORTAIGNE. B «*Caractérisation des polymères par couplage CPG/SM*» Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation PE 3 768 – 1.

[65]. DE GRAEVE. J, BERTHOU. F, PROST « *Méthodes Chromatographiques Couplée à la spectrométrie de masse* » MASSON.

[66]. GARNIER J-P, BRANDELY M-L TABURET A-M «*Actualités en Pharmacie et Biologie Cliniques Maladie d'Alzheimer, accidents vasculaires cérébraux, protéomique, métabolomique*» 15è Série. John Libbey 2008.

[67]. Bouchonnet. S, Libong. D « *Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse*» L'Actualité Chimique, 2004, 275, pp. 7-14.

[68]. GILLIAN MCMAHON «*Analytical Instrumentation A Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments*» 2007; *p43.*

[69]. Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T. « *Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bioorganiques*» Spectra Analyse, 1999, 207(28), pp. 11-25.

[70]. Olivier NICOLAS, Damien ROBERT, Marie T. KELLY, BRESSOLLE. F «*Traitements de l'échantillon biologique avant l'analyse chromatographique Applications à la pharmacocinétique et à la toxicologie*» Annales de Toxicologie Analytique, vol. XVI, n° 3, 2004 p 200.

[71]. Emuri Abe, Stanilas Grassin Delyle, Jean Claude Alvarez «*Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés Liquid-liquid extraction: theory, applications and difficulties*» Annales de Toxicologie Analytique 2010; 22(2): 51-59.

[72]. Wells. D.A « *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation Methods and Automation Strategies* » Program in Pharmaceutical and Biomedical p 48.

[73]. Alain Le Hir, Jean-Claude Chaumeil, Denis Brossard, « *Pharmacie galénique, bonne pratique de fabrication d'un médicament* », 8éme édition Masson, Paris, 2009 ; p282.

[74]. Aravindaraj Joghee Raju, Gopinath Ram, Rajan Sekar, Mahesh Kumar Siddaiah, «*Development and Application of a Validated Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Determination of Dexchlorpheniramine Maleate in Human Plasma*» Iranian J of Pharmaceutical Sciences Summer 2007: 3(3) p161-170

[75]. Jean-Marc Aiache,Jean-Michel Cardot,Valérie Hoffart «*Médicaments et autres produits de santé*» ELSEVIER MASSON 2011 ; p 30.

[76]. Kealey. D, Haines. P.J «*Analytical Chemistry*» BIOS Scientific Publishers Limited, 2002

[77]. Xiaohe S. Qi , R. Brent Miller, Yoshihiro Namiki, John Zhang, Robert Jacobus «*Effect of water content in perchloric acid on the non-aqueous potentiometric titration of nitrogen-containing compounds*» J of Pharma and Biomed Analysis 16 (1997) 413–418.

[78]. S. Bardot P. Vest C. Renar « *Dosage de la ciprofloxacine en milieu sérique par chromatographie liquide haute performance*» Ann Biol Clin, vol. 63, n° 5, septem-octobre 2005.

Soutenue publiquement par : Kemel Meriem

Directeur de recherche : M H GUERMOUCHE

APPORT DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES DANS L'ANALYSE DE LA DEXCHLORPHENIRAMINE DANS LA MATIERE PREMIERE, LE PRODUIT FINI ET LE PLASMA

Résumé

Les médicaments antagonistes des récepteurs à l'histamine de type H_1 sont les plus prescrits dans le monde, en raison de leurs effets symptomatiques favorables au niveau des muqueuses nasales et la peau. Parmi lesquels on trouve le maléate de dexchlorphéniramine.
Plusieurs méthodes analytiques ont été reportées pour doser le maléate de dexchlorphéniramine dans la matière première, le produit fini et le plasma, elles sont basées sur les méthodes chromatographiques. Dans la pharmacopée Européenne, le pouvoir rotatoire et l'infrarouge sont employés pour le test d'identification, l'HPLC et la CPG pour les tests de pureté. La teneur en DCM a été déterminée par la méthode potentiométrique en milieu anhydre. La chromatographie en phase liquide est la méthode de choix pour doser la DCP dans les comprimés. La méthode a été validée selon les recommandations de l'ICH pour le dosage en routine. Le test de dissolution de la forme solide mené par CPG est jugé conforme. La quantification de la dexchlorphéniramine dans le plasma a été réalisée par CPG/SM ce qui nous a permis d'obtenir les paramètres pharmacologiques.

Mots clés: maléate de dexchlorphéniramine, bromphéniramine, HPLC, CPG, CPG/SM, validation.

Abstract

Antagonists of H_1 histamine receptors are the most prescribed drugs, due to their symptomatic effects at the levels of nasal mucosa, and the skin. Among which one finds the dexchlorpheniramine maleate.
Various methods have been reported for the analysis of dexchlorpheniramine maleate in pharmaceutical substance, pharmaceutical preparations and in plasma; they are based on the chromatographic methods. In European pharmacopeia, a specific rotation and infrared absorption spectrum analysis are employed for identification test, HPLC and CPG for purity test. Non-aqueous titration method is utilized for the quantitative determination of DCM. On the other hand, a high performance liquid chromatographic technique is a useful tool for the analysis of pharmaceutical tablets. The method was validated and met all analysis requirements of quality assurance and quality control recommended by ICH. The test of dissolution of the solid form carried out by CPG is considered to be in conformity. Another method was developed for the determination of plasma concentrations of DCP by gas chromatography-Mass Spectrometric what enabled us to obtain the pharmacological parameters.

Keywords: dexchlorpheniramine maleate, brompheniramine, HPLC, CPG, GC/MS, validation.

ملخص

تعتبر الأدوية المضادة لمستقبلات الهيستامين الأكثر استعمالا لما لها من آثار إيجابية على مستوى الأنسجة المخاطية والجلد. من بين هذه الأدوية نجد ماليات الدكسكلورفنيرامين. هناك العديد من الطرق التحليلية التي تم اعتمادها من اجل معايرة هذا المركب في المادة الأولية و الناتج النهائي و في الدم. هذه الطرق أغلبها عبارة عن تقنيات الكروماتوغرافيا. حسب الفارمقوبيا الأوروبية : تخضع المادة الأولية لاختبار الكشف و اختبارات النقاوة و المعايرة. بعدها ننتقل إلى مراقبة الناتج النهائي حيث يتم معايرته وفقا للمعايير المعمول بها. اختبار انحلال قرص الدكسكلورفنيرامين أنجز بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية و الذي أعطى نتائج ايجابية.

أما بالنسبة لتقدير نسبة الدكسكلورفنيرامين التي تصل إلى الدم تتم بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية المرفقة بمطياف الكتلة و التي مكنتنا من تحديد العوامل الفارمقلوجية.