

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA-1



Faculté de Médecine
Département de Pharmacie
6^{ème} année pharmacie
Promotion 2018



Mémoire de fin d'étude :

**COMPARAISON ENTRE DEUX METHODES
D'ANALYSE DE LA
METFORMINE HYDROCHLORIDE :
SPECTROSCOPIE-UV ET HPLC**

En vue de l'obtention du titre de DOCTEUR en Pharmacie

Travail fait par :

LAOUES Nour el imen
OUDAHMANE Imane

Promoteur du mémoire :

P^r GHARBI Abdelaziz, Pharmacien industriel, Professeur en Chimie Analytique

Présenté devant les Jury :

D^r AYACHI Nabila, Maitre-assistante en Galénique
D^r ARAR Karima, Maitre-assistante en Pharmacognosie
D^r IMOUDACHE Hichem, Maitre-assistant en chimie Minérale

Présidente de Jury
Examinatrice
Examinateur

2017-2018

Dédicace 01 :

A Mes Parents : qui ont tout sacrifié pour que ce jour arrive...

Mes Frères, qui étaient toujours là pour me soutenir...

Mes Sœurs, qui m'encourageaient tout au long de mon chemin...

Mes nièces et neveux...

Mes Copines Nawelle, Sarra et Hayet, à Fatima, Feriel, Imen et Fatma... et toutes mes amies....

A toute personne de ma promotion "2012-2018", ma deuxième famille ;

A mes enseignants un par un, à mon promoteur

Pr GHARBI

*qui n'a pas hésité à encadrer cette thèse et à l'orienter ;
A Dr FEKKAR, qui est toujours présent avec ses conseils et ses leçons de vie.*

A toute personne qui m'a inspiré et soutenu ...

A l'âme de ceux, qui nous ont quittés, et à ceux qui continuent à battre en silence...

A vous tous, je dédie ce modeste travail, qui, sans vous, et l'aide d'ALLAH il n'aurait jamais vu le jour !

LAOUES Nour el imen

Dédicace 02 :

A mes parents :

Aux êtres les plus précieux au monde, tout au long de mes années d'études vous m'avez encouragé, soutenu et incité à faire sortir le meilleur de moi-même. Vous avez été une source de force et de bonheur. Que dieu vous garde et procure santé, bonheur et longue vie

A mes deux sœurs Kahina et Massilia et à mon frère Mohammed :

Vous avez toujours été à mes côtés, vous n'avez pas cessé de croire en moi et en mes capacités.

A toute ma famille :

A mes deux tantes Fazia et Nora

A mon cousin Sami

Qui n'a pas hésité à m'aider à chaque fois qu'il avait l'occasion de le faire

A tous mes enseignants

A mon Professeur GHARBI :

Qui a semé en moi l'amour de la Chimie analytique. Qui malgré tous ses engagements et occupations, n'a pas hésité à être mon promoteur et à encadrer mon mémoire de fin d'étude.

A Madame Nadia et Mr Ricardo du CCU Alger

A vous tous, je dédie ce modeste travail

OUADAHMANE Imane

Remerciements :

Nous tenons tout d'abord à remercier le Bon Dieu, le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Nous voudrions remercier toute personne ayant participé de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail, en premier notre promoteur :

***Pr GHARBI Abdelaziz**, Pharmacien industriel, Professeur en Chimie Analytique qui a toujours été à notre écoute, pour nous orienter et nous conseiller.*

Nous voudrions également remercier :

***D' AYACHI Nabila**, Maitre-assistante en Galénique d'avoir accepté de présider le jury et de faire part de notre mémoire de fin d'études.*

***D' ARAR Karima**, Maitre-assistante en Pharmacognosie et
D' IMOUDACHE Hichem, Maitre-assistant en chimie Minérale qui nous ont fait l'honneur d'examiner notre présent travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

Nos vifs remerciements vont aussi aux :

*Gens du CCU d'Alger
Responsables des laboratoires de contrôle-qualité des différents terrains de stage.*

Table des matières :

DEDICACE 01 :	I
DEDICACE 02 :	II
REMERCIEMENTS :	III
TABLE DES MATIERES :	IV
LISTE DES ABREVIATIONS :	VIII
LISTE DES FIGURES :	XI
LISTE DES TABLEAUX :	XIII
INTRODUCTION	1
PARTIE THEORIQUE	2
CHAPITRE I : LA METFORMINE HYDROCHLORIDE	3
I- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA METFORMINE :	5
II- SYNTHESE CHIMIQUE :	7
III- PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES ET MECANISME D’ACTION:	7
III-1- PHARMACOCINETIQUE :.....	7
III-2- PHARMACODYNAMIE ET MECANISME D’ACTION :.....	8
IV- INDICATIONS DE LA METFORMINE HYDROCHLORIDE :	9
V- EFFETS INDESIRABLES ET PRECAUTIONS D’EMPLOI DE LA METFORMINE HYDROCHLORIDE :	12
VI- FORMES GALENIQUES DE LA METFORMINE HYDROCHLORIDE :	13
CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER	14
I- LA SPECTROSCOPIE UV :	14
I-1- PRINCIPE DE LA SPECTROSCOPIE UV-VIS :	14
I-2- APPAREILLAGE :	16
I-2-1- Sources de radiations électromagnétiques :	16
I-2-2- Sélecteurs de longueurs d’onde :	17
I-2-3- Cuve :.....	17
I-2-4- Détecteur :	17
I-2-5- Dispositif du traitement de signal :	17
I-3- ASPECTS QUALITATIF ET QUANTITATIF DE LA SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE :	17
I-3-1- Aspect qualitatif de la spectroscopie-UV:	17
I-3-2- Aspect quantitatif :	17
I-4- APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE L’INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE :	18
I-5- LES LIMITES DE LA SPECTROSCOPIE UV :	18
II- LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE-PERFORMANCE :	19
II-1- HISTORIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :	19

II-2-	PRINCIPE DE HPLC :	20
II-3-	APPAREILLAGE DE HPLC :	20
II-3-1-	La phase mobile :	21
II-3-2-	La pompe :	21
II-3-3-	L'injecteur :	21
II-3-4-	Colonne :	21
II-3-5-	La phase stationnaire :	22
II-3-6-	Détecteur :	22
II-4-	LE TRACE CHROMATOGRAPHIQUE OU CHROMATOGRAMME :	22
II-4-1-	Le facteur de rétention K' ou capacité :	23
II-4-2-	La sélectivité α :	24
II-4-3-	Efficacité N :	24
II-4-4-	Effet de la phase mobile :	24
II-4-5-	Résolution R :	25
II-5-	ASPECTS QUALITATIF ET QUANTITATIF DE LA CHROMATOGRAPHIE :	25
II-5-1-	Aspect qualitatif :	25
II-5-2-	Aspect quantitatif :	25
II-6-	DOMAINE D'APPLICATION DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE :	26
II-7-	LIMITES DE L'HPLC :	26

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE..... 27

I- LE CONTROLE DE LA METFORMINE HYDROCHLORIDE MATIERE PREMIERE :..... 28

I-1-	LE CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE DE LA MATIERE PREMIERE:	28
I-1-1-	Aspect :	28
I-1-2-	Identification :	28
I-1-3-	Dosage de l'hydrochloride de metformine matière première :	29
I-1-4-	Les cendres sulfuriques dans la matière première :	29
I-1-5-	Les Métaux lourds :	30
I-1-6-	Impuretés organiques :	30
I-2-	CONTROLE PHARMACO-TECHNIQUE DE LA METFORMINE HYDROCHLORIDE MATIERE PREMIERE : PERTE A LA DESSICCATION	32
I-3-	CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DE LA METFORMINE HYDROCHLORIDE MATIERE PREMIERE :	32
I-3-1-	Dénombrement des germes aérobies viables totaux :	32
I-3-2-	Recherche des microorganismes spécifiés :	33

II- CONTROLE IN PROCESS DE LA METFORMINE HYDROCHLORIDE : PARAMETRES PHARMACO-TECHNIQUES :..... 34

II-1-	ASPECT DES NOYAUX :	34
II-2-	MESURE DES DIMENSIONS DU COMPRIME NU :	34
II-3-	TEST D'UNIFORMITE DE MASSE :	34
II-4-	TEST DE FRIABILITE :	34
II-5-	RESISTANCE A LA RUPTURE DES COMPRIMES :	35
II-6-	TEST DE DESAGREGATION :	35

III- CONTROLE DE LA METFORMINE HYDROCHLORIDE PRODUIT FINI : 35

III-1-	CONTROL PHYSICO-CHIMIQUE DE LA METFORMINE HYDROCHLORIDE PRODUIT FINI :	35
III-1-1-	Aspect du produit fini :	35
III-1-2-	Identification du produit fini :	35
III-1-3-	Dosage du chlorhydrate de metformine produit fini :	36

III-1-4- Le dosage des impuretés dans le produit fini :	36
III-2- CONTROLE PHARMACO-TECHNIQUE DU PRODUIT FINI :	37
III-2-1- Test de dissolution :	37
III-2-2- Test de sécabilité :	38
III-3- CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DES PRODUITS FINIS:	38
PARTIE PRATIQUE	39
INTRODUCTION DE LA PARTIE PRATIQUE :	40
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES :	41
I- MATERIEL :	41
I-1- APPAREILLAGE :	41
I-1-1- Spectromètre UV :	41
I-1-2- Appareil HPLC :	41
I-1-3- Balances analytiques :	42
I-1-4- Bain à Ultrasons :	42
I-1-5- pH-mètre :	42
I-1-6- Appareils à filtration sous vide en verre :	42
I-1-7- Appareil de purification de l'eau distillée :	42
I-2- VERRERIES :	42
I-2-1- Verrerie de non précision : stérilisable à la chaleur :	42
I-2-2- Verrerie de précision :	43
I-3- CONSOMMABLES :	43
I-3-1- Les Filtres :	43
I-3-2- Seringues :	43
I-3-3- Vials :	43
I-4- AUTRES :	43
II- REACTIFS :	44
II-1- ACETONITRILE :	44
II-2- ACIDE PHOSPHORIQUE :	44
II-3- CHLORURES DE SODIUM (NaCl) :	45
II-4- EAU PURIFIEE :	45
II-5- LE 1-HEPTANE SULFONATE DE SODIUM :	45
III- METHODES :	46
III-1- METHODE 01 : SPECTROSCOPIE UV	46
III-1-1- Conditions opératoires de la méthode 01 :	46
III-1-2- Protocole de la méthode spectroscopique UV :	46
III-1-3- Lecture :	47
III-2- METHODE 02 : HPLC :	47
III-2-1- Conditions opératoires de la méthode 02 :	48
III-2-2- Le protocole de la méthode HPLC :	48
III-2-3- L'analyse HPLC et le traitement des résultats :	50
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS :	51
I- RESULTATS ET DISCUSSION DE LA SPECTROSCOPIE UV :	51
I-1- ANALYSE QUANTITATIVE PAR SPECTROSCOPIE UV :	51
I-1-1- La courbe d'étalonnage de la spectroscopie UV :	51
I-1-2- Résultats de l'analyse quantitative des PF par spectroscopie UV :	54

I-2-	ANALYSE QUALITATIVE PAR SPECTROSCOPIE UV : LES BALAYAGES	67
I-2-1-	<i>Balayage de la MP 01</i> :	67
I-2-2-	<i>Balayage d'un PF 850-09</i> :	68
I-2-3-	<i>Balayage MP 02</i> :	69
I-2-4-	<i>Balayage PF 500-07</i> :	70
I-2-5-	<i>1^{er} Balayage PF 1000-26</i> :	71
I-2-6-	<i>2^{ème} balayage du PF 1000-26</i>	71
I-2-7-	<i>3^{ème} balayage PF 1000-26</i> :	72
II- RESULTATS ET DISCUSSIONS DE L'HPLC :		73
II-1-	RESULTATS BRUT DE L'ANALYSE HPLC	74
II-1-1-	<i>HPLC du STD (HPLC 01)</i> :	74
II-1-2-	<i>HPLC du PF 1000-28 (HPLC 01)</i> :	75
II-1-3-	<i>HPLC du STD (HPLC 02)</i> :	76
II-1-4-	<i>HPLC du PF 500-04 (HPLC 02)</i> :	76
II-1-5-	<i>HPLC du PF 850-13 (HPLC 02)</i> :	77
II-2-	RESULTATS DE L'ANALYSE QUANTITATIVE PAR HPLC :	77
II-3-	RESULTATS DE L'ANALYSE QUALITATIVE PAR HPLC :	80
III- DISCUSSIONS GLOBALE DES RESULTATS OBTENUS PAR LES DEUX METHODES :		81
III-1-	COMPARAISONS DES RESULTATS OBTENUS PAR LES DEUX METHODES:	81
III-2-	COMPARAISONS DES MODES OPERATOIRES DE L'HPLC ET DE LA SPECTROSCOPIE-UV :	83
CONCLUSION		84
BIBLIOGRAPHIE		88
LISTE DES ANNEXES		xv

Liste des abréviations :

A	Absorbance
α	Sélectivité d'une colonne
ADO	Anti-Diabétique Oral
AFNOR	Agence Française de Normalisation
Ai	Aire d'un pic chromatographique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMP	Adenosine MonoPhosphate
AMPK	Adenosine MonoPhosphate Kinase
AP-1	Activator Protein-1
ATP	Adenosine TriPhosphate
BCS	Biopharmaceutical Classification System
BGN	Bactérie Gram-Négatif
BP	British Pharmacopeia
BPF	Bonne pratique de fabrication
BPL	Bonne Pratique de Laboratoire
C	Concentration
C_f	Produit Conforme
C18	Octadecyl
C8	Octyl
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CGL	Chromatographie Gaz-Liquide
CL	Chromatographie Liquide
COA	Certificate Of Analysis
cp	Comprimé
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CQ	Contrôle-Qualité
D₂	Deutérium
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
DID	Diabète Insulino-Dépendant
DNID	Diabète Non Insulino-Dépendant
d_R	Distance de rétention
E	Energie
éch	Echantillon

ϵ	Constante d'absorption molaire à une longueur d'onde donnée
EP	Europeen Pharmacopeia
g	gramme
h	constante de Planck
H	Hauteur de plateau théorique
H₂	Hydrogène
HPLC	High Perfomance Liquide Chromatography
I	Lumière incidente
ICH	International Conference Harmonisation
IP	Indian Pharmacopeia
IR	Infrarouge
ISO	International Standards Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JP	Japonaise Pharmacopeia
K'	Capacité d'une colonne
λ	Longueur d'onde
L1	Colonne chromatographique à groupement octadecylsilane
L9	Colonne chromatographique à groupement échangeur de cation
LDL	Low Density Lipoprotein
m	Masse
M	Masse moléculaire
mg	milligramme
mL	Millilitre
MM	Masse moyenne
Mmol	Millimole
MMP-9	Matrix Metallopoteinase Protein-9
Moy	Moyenne
MP	Matière première
m-TOR-C1	Mammalian Target of Rapamycin Complexe-1
N	Efficacité d'une colonne
NCf	Produit Non Conforme
Nm	Nanomètre
ν	Fréquence d'une longueur d'onde
OCT	Organic Cation Transpoter

OMS	Organisation Mondiale de Santé
P	Polarité
PE	Prise d'Essai
PF	Produit Fini
pH	Potentiel d'hydrogène
pKa	fonction égale au moins le logarithme décimal ($-\log_{10}$)de la constante d'acidité
PM	Poids Moyen
PS	Phase Stationnaire
R	Résolution entre deux pics chromatographiques
RP-HPLC	Reverse-Phase High Performance Liquide Chromatography
RSD	Relative Standard Deviation
SCR	Substance chimique de référence
SQ	Système Qualité
STD	Standard
T	Transmittance
t_{1/2}	Temps de demi-vie
t_M	Temps mort
t_R	Temps de rétention
UFC	Union Foming Colony
USP	United-States Pharmacopeia
UV	Ultraviolet
V	Volume
V_d	Volume de distribution
vis	Visible
VLDL	Very Low Density Lipopotein
VN	Valeur normale
V_R	Volume de rétention
ω	Largeur de la base dans le chromatogramme

Liste des Figures :

<i>Figure 1 : Structure de la molécule de la metformine hydrochloride, un biguanide antidiabétique [2].</i>	3
<i>Figure 2 : Photographie de la Galéga officinalis [182].</i>	3
<i>Figure 3 : Développement historique des biguanides à partir de la guanidine [97].</i>	4
<i>Figure 4 : Top 10 drugs aux US entre juillet 2011 et juin 2012 [180].</i>	5
<i>Figure 5: Réaction de synthèse chimique de la metformine. [143].</i>	7
<i>Figure 6: Mécanisme d'action de la metformine au niveau hépatique [153].</i>	9
<i>Figure 7 : La prise en charge du diabète type 2 [183].</i>	11
Figure 8 : Schéma du domaine spectral de l'UV-visible [70].	14
<i>Figure 9 : Schéma explicatif d'une radiation électromagnétique montrant son champs électrique, magnétique et la direction de propagation [43].</i>	14
<i>Figure 10 : Les types de spectromètres : instruments dans l'UV-visible [78].</i>	16
Figure 11 :Schéma d'une installation HPLC [78].	20
Figure 12 : Chromatogramme [40].	22
<i>Figure 13 : Caractéristiques du pic idéal [78].</i>	23
<i>Figure 14 : Spectre infrarouge d'hydrochloride de metformine [03].</i>	28
Figure 15 : Spectre infrarouge d'un PF de metformine hydrochloride [03].	35
<i>Figure 16 : Informations relatives à l'emploi de l'ACN [15].</i>	44
<i>Figure 17 : Informations relatives à l'emploi de l'acide phosphorique [15].</i>	44
<i>Figure 18 : Résultats de lecture spectroscopique de la série de dilution.</i>	52
<i>Figure 19 : Courbe d'étalonnage du STD metformine hydrochloride par spectroscopie UV.</i>	53
<i>Figure 20 : Courbe de tendance linéaire de l'étalonnage par spectroscopie UV.</i>	53
<i>Figure 21 : Les absorbances des PF 500 et de leurs standards</i>	57
<i>Figure 22 : Les Teneurs moyennes en mg/cp des PF 500 mg de Metformine Hydrochloride</i>	58
<i>Figure 23 : Courbe des absorbances des PF 500 en fonction de leurs</i>	58
<i>Figure 24 : les absorbances de deux PF 850 mg analysés par UV</i>	59
<i>Figure 25 :Diagramme des absorbances moyennes des PF 850 et de leurs STD</i>	60
<i>Figure 26 : Concentrations des PF 850</i>	61
<i>Figure 27 : Absorbances des PF 850 en fonction de leurs concentrations</i>	62
<i>Figure 28 : Absorbances des PF 1000 mg et de leurs STD</i>	62
<i>Figure 29 : Concentrations des PF 1000 mg dosés</i>	63
<i>Figure 30 : Courbes des absorbances en fonction des Concentrations des PF 1000 mg.</i>	64
<i>Figure 31 : Spectre d'absorption de la MP 01 :</i>	67
<i>Figure 32 : Balayage d'un PF 850 mg (PF 09)</i>	68
<i>Figure 33 : Balayage de la MP 02</i>	69
<i>Figure 34 : Balayage d'un PF 500 mg (PF 07)</i>	70
<i>Figure 35 : 1er balayage du PF 26</i>	71
<i>Figure 36 : 2ème balayage du PF 26</i>	71
<i>Figure 37 : 3ème balayage du PF 26</i>	72
<i>Figure 38 : Chromatogramme du STD (HPLC 01)</i>	74

<i>Figure 39 : Chromatogramme du PF 28 (HPLC 01)</i>	75
<i>Figure 40 : Chromatogramme du STD (HPLC 02)</i>	76
<i>Figure 41 : Chromatogramme du PF 04 (HPLC 02)</i>	76
<i>Figure 42 : Chromatogramme du PF 13 (HPLC 02)</i>	77
<i>Figure 43 : Aires moyennes de deux PF 1000 et du STD</i>	78
<i>Figure 44 : Aires moyennes de quelques PF et du STD</i>	78
<i>Figure 45 : Courbe de régression linéaire des concentrations obtenues par HPLC en fonction de celles obtenues par spectroscopie-UV</i>	82

Liste des Tableaux :

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques de la metformine hydrochloride	6
Tableau 2 : Adaptation de la posologie de l'hydrochloride de metformine en fonction du DFG [183].	12
Tableau 3 : Exemples de chromophores [70, 78].....	15
Tableau 4: Exemples de sources continues [43].....	16
Tableau 5 : Les substances apparentées de l'hydrochloride de metformine (15).	31
Tableau 6 : Les conditions opératoires du test de dissolution (01) exigées par l'USP (2).	37
.....	
Tableau 7 : Résultats de la spectroscopie UV des PF 500 de Metformine Hydrochloride.	54
Tableau 8 : Résultats de la spectroscopie UV des PF 850 de Metformine Hydrochloride.	55
Tableau 9 : Résultats de la spectroscopie UV des PF 1000 de Metformine Hydrochloride. ...	56
Tableau 10 : Discussion des absorbances obtenues des PF 500	57
Tableau-11- : Discussion des concentrations calculées des PF 500.....	58
Tableau 12 : Discussion des absorbances obtenues des PF 850	60
Tableau 13 : Discussion des concentrations calculées des PF 850.	61
Tableau 14 : Discussion des absorbances obtenues des PF 1000	63
Tableau 15 : Discussion des concentrations calculées des PF 1000.	63
Tableau 16 : RSD% des absorbances des PF 500 mg de metformine hydrochloride	65
Tableau 17 : RSD% des absorbances des PF 850 mg de metformine hydrochloride	65
Tableau 18 : RSD% des absorbances des PF 1000 mg de metformine hydrochloride	66
Tableau 19 : Tableau des longueurs d'onde maximales d'absorption le la MP 01 et de ses PF:	72
.....	
Tableau 20 : Tableau des longueurs d'onde maximales d'absorption le la MP 01 et de ses PF	73
.....	
Tableau 21 : tableau des RSD% d'un PF 1000 mg	73
Tableau 22 : RSD% des Aires des pics	79
Tableau 23 : Les RSD% des aires obtenu du PF 29.....	79
Tableau 24 : RSD% de la 1 ^{ère} HPLC.....	80
Tableau 25 : RSD% de la 2 ^{ème} HPLC	80
Tableau 26 : Concentrations des PF par spectroscopie UV et HPLV-UV	81

Résumé :

Résumé :

La metformine hydrochloride est un biguanide antidiabétique oral sensibilisateur à l'insuline. Son contrôle-qualité est basé sur ses propriétés physico-chimiques ainsi que sa forme galénique, et pour cela différentes méthodes sont utilisées.

Dans notre étude, deux méthodes d'analyse instrumentales ont été comparées pour la détermination des concentrations des produits finis de la metformine hydrochloride. Il s'agit de spectroscopie UV et l'HPLC. Ces deux méthodes de principes différents sont utilisées lors des analyses qualitatives et quantitatives effectuées sur cette molécule. La comparaison est faite en termes de caractéristiques de chaque méthode et de la qualité des résultats obtenus. Toutes les deux présentent une bonne sensibilité, répétabilité, et reproductibilité, elles sont précises. Le coefficient de régression linéaire est de $R^2 = 0.995$. Les résultats obtenus sont fortement corrélés et les deux méthodes se valent sur le plan analytique.

Abstract :

Metformin Hydrochloride is a biguanide oral antidiabetic insulin sensitizer : its quality-control is based on its physico-chemical properties also on its form, therefor, different methods are used.

In our studies, two instrumental methods of analysis were compared to determine the concentration of metformin in tablets. It is UV spectroscopic and HPLC. this two methods with different principles are used in qualitative and quantitative analysis of this drug. The comparaison is based on the characteristics of each method and the quality of its results. Both the two methods are sensible, repetable and reproducible, they are precises. The coefficient of squar linear regression is $R^2=0.995$. All the results are correlated and the two methods are analytically identical.

ملخص:

ميتفورمين هيدروكلوريد عبارة عن بيغوانيد فموي يزيد من حساسية الخلايا للأنسولين: تعتمد مراقبة نوعيته على خصائصه الفيزيائية والكيميائية وأيضًا على شكلها الصيدلاني النهائي، ولتحقيق ذلك، يتم استخدام طرق مختلفة. في دراستنا، تمت مقارنة طريقتين أساسيتين للتحليل لتحديد تركيز الميتفورمين في المركب النهائي، وهي المطيافية فوق البنفسجية (spectroscopie UV) والكروماتوغرافيا السائلة عالية الضغط (HPLC)، كلتا الطريقتين تستعمل في التحليل النوعي والكمي لهذا الدواء. تعتمد هذه المقارنة على خصائص كل طريقة وجودة نتائجها. كل من الطريقتين معقولة، يمكن تكرارها واستنساخها، كلتاها دقيقتان. معامل الانحدار الخطي R^2 يساوي 0.995. كل النتائج مرتبطة ببعضها والطريقتان متطابقتان على المستوى التحليلي.

INTRODUCTION

Chaque laboratoire de chimie, travaillant dans n'importe quel domaine d'analyse est conscient de la nécessité d'assurer la fiabilité de ses résultats ; et quand il s'agit d'un laboratoire de contrôle-qualité du médicament, la tâche devient plus complexe. Le responsable du contrôle-qualité a toujours comme défi – dans les limites d'un budget mis à sa disposition- de prendre des décisions efficaces dont le choix de la méthode d'analyse, et ce, ne devrait en aucun cas être fait au détriment de la qualité de ce dernier.

Le chlorhydrate de metformine ($C_4H_{11}N_5$, HCl) est une petite molécule d'origine synthétique qui a plus d'atomes d'azote que de carbone. C'est un antidiabétique oral (ADO) de la famille des biguanides. Mis sur le marché mondial depuis l'an 2000, il est devenu en 2012 le médicament du premier choix pour tous les patients présentant le diabète de type 2, suite à la déclaration des experts en matière de diabète aux Etats-Unis et en Europe.

Plusieurs industries pharmaceutiques fabriquent la metformine, et utilisent différentes méthodes analytiques de référence ou déjà validées dans l'analyse de cette molécule, comme matière première (MP) et également dans le produit fini (PF).

Nombreuses sont les méthodes qui s'avèrent intéressantes, mais celle que nous devons utiliser doit être peu onéreuse et donne des résultats de qualité.

Le but de notre étude est de comparer entre la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP, HPLC en anglais) couplée à un détecteur dans l'ultra-violet (UV) et la spectroscopie-UV en utilisant différents critères :

Quelle serait donc la meilleure méthode d'analyse de la metformine hydrochloride ?

Notre travail comportera deux parties. Une partie théorique dans laquelle nous allons présenter dans un premier temps la metformine en la traitant sur des niveaux différents, et dans un second moment les méthodes à comparer. Nous détaillerons par la suite les essais de routine réalisés lors du contrôle-qualité de cette molécule.

Dans la partie pratique, notre étude est réalisée sur deux produits à différents dosages : 500 mg, 850 mg et 1000 mg de metformine hydrochloride PF. Pour chaque méthode nous avons traité à la fois son aspect quantitatif et qualitatif. Le matériel et les réactifs utilisés lors des analyses par spectroscopie-UV et HPLC sont détaillés dans un chapitre, ainsi que le protocole suivi pour la réalisation de chaque méthode.

Les résultats brutes sont collectés dans des tableaux ou des figures selon le type de l'analyse représentés dans des graphiques et commentés. La discussion globale est basée sur les valeurs des résultats après traitement et aussi sur les caractéristiques de chaque méthode.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I : LA METFORMINE HYDROCHLORIDE

La metformine hydrochloride (**Figure-1-**) est défini comme “un dérivé de biguanide, permet de normaliser un niveau de glucose trop élevé, en présence d’insuline ” [53].

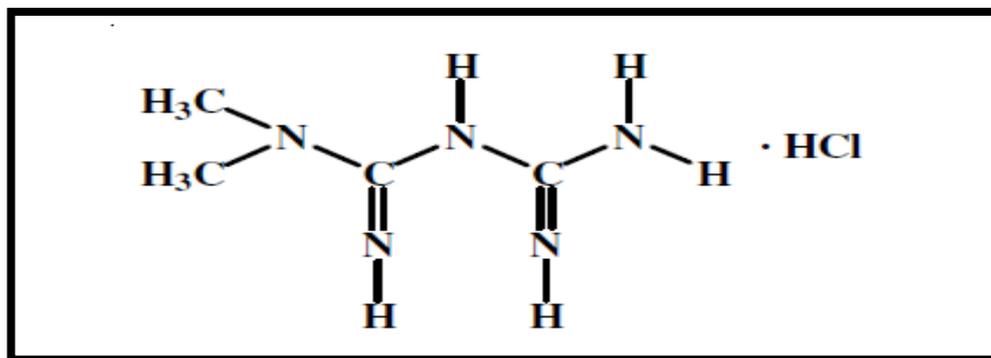


Figure 1 : Structure de la molécule de la metformine hydrochloride, un biguanide antidiabétique [2].

La metformine est un biguanide, appelé aussi 1,1-Dimethylbiguanide monohydrochloride [168]. C'est un dérivée d'une substance active appelée « galégine » qui est un alcaloïde monoguanidine (isoprenylguanidine) (**Figure-3-**) [33,104,114,181].

La galégine est extraite des fleurs du lilas français *Galega officinalis* (**Figure-2-**), elle est également retrouvée dans les graines et les feuilles. *Galega officinalis*, une plante médicinale de la famille des fabaceae connue dans la médecine traditionnelle par ses différentes propriétés, depuis le moyen-âge [31,44,114,121,142].

Parmi ses propriétés thérapeutiques, son action hypoglycémiant exploitée dans le traitement du diabète, mais elle a été abandonnée à cause de sa grande toxicité, qui est due principalement à sa richesse en guanidines surtout la galégine qui a un faible rapport effet/risque [53,96,97,136,141].



Figure 2 : Photographie de la *Galega officinalis* [182].

La démonstration de l'effet hypoglycémiant de la guanidine chez les animaux suivi par sa grande toxicité, a ouvert les portes de recherche d'autres molécules efficaces et moins toxiques.

Le développement est passé par la découverte de la galéguine, puis de deux biguanides synthétiques : synthalin A et synthalin B délaissés dès l'apparition de l'insuline, et enfin la phenphormine, metformine et buformine. Seule la metformine a satisfait ces recherches car la buformine et la phenformine ont été retirés du marché en 1970 suite à leurs effets indésirables toxiques [37,97,153]. La **Figure -03-** montre les structures chimiques de ces molécules.

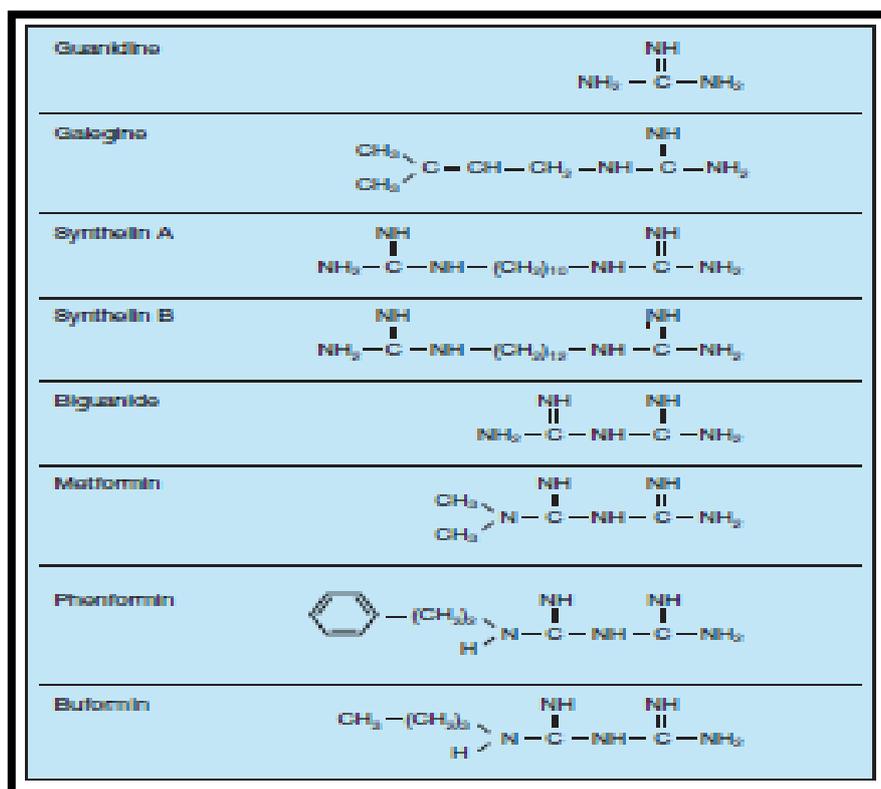


Figure 3 : Développement historique des biguanides à partir de la guanidine [97].

L'action antidiabétique de la metformine a été prouvée pour la première fois en **1957** par Dr Jean Sterne (clinicien français) et son équipe [104].

La metformine a eu son premier visa de commercialisation le **19 Mars 1959**, suite à la publication de Sterne intitulée : "Du nouveau dans les antidiabétiques. La NN diméthylamine guanyle (N.N.D.G.)" en 1957 [51, 160].

Elle est introduite comme ADO au même titre que la phenformine (phényléthyl biguanide) aux Etats-Unis et la buformine (monobutyl biguanide) en Allemagne (**Figure-3-**). Ces deux dernières ont été retirées du marché vers la fin des années **1970**, à cause des effets secondaires observés, en particulier les acidoses lactiques pouvant mener à la mort [76, 97, 104].

Le seul biguanide antidiabétique encore commercialisé est la metformine, elle ne cesse de prouver son efficacité et son innocuité [36, 51, 89].

La **Figure-4-** représente les antidiabétiques les plus prescrits aux Etats-Unis entre juillet 2011 et juin 2012. La metformine a été prescrite plus de 49 millions fois [180].

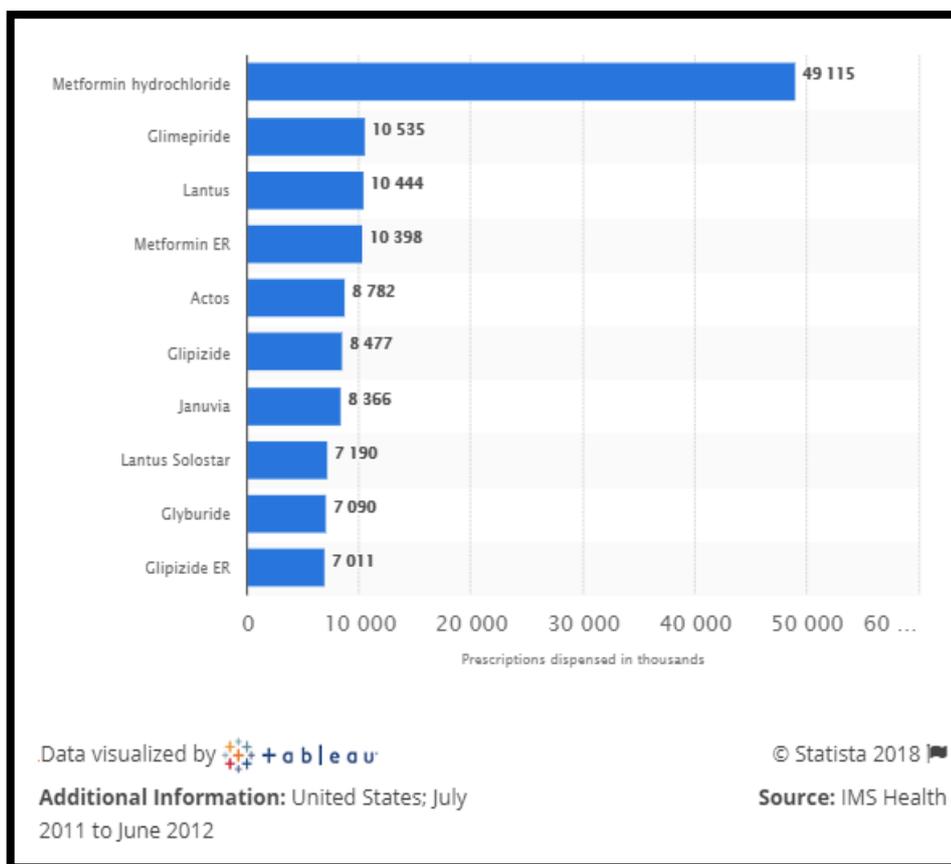


Figure 4 : Top 10 drugs aux US entre juillet 2011 et juin 2012 [180].

C'est le traitement de première intention lors du diabète de type 2 [21, 33].

La metformine est une drogue officielle à la Pharmacopée Américaine (USP), Britannique (BP), Européenne (EP) et Indienne (IP). Elle est à la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de **2017**. En Algérie, elle figure dans la liste I de la Nomenclature Nationale Des Produits Pharmaceutiques A Usage De La Médecine Humaine [07, 08,128,148,183].

I- Propriétés physico-chimiques de la metformine :

La metformine hydrochloride ou « *Metformini hydrochloridum* », de formule chimique brute $C_4H_{12}ClN_5$ est un composé hygroscopique de goût amer. C'est une petite molécule ayant plus d'atomes d'azote que de carbone, Son point de fusion est bas [02,33, 51, 131, 159].

Les études cristallographiques et la spectroscopie de masse montrent la nature dimérique de la metformine due à la présence des liaisons hydrogènes. Sa structure cristalline est monoclinique : il s'agit de deux guanides planes avec deux angles droits de 90° et un troisième égal à $67,9^\circ$ [27, 51, 57].

Les liaisons $C=N$ de la metformine et ses sites de protonation majorent son caractère hydrophile, elle est de ce fait très soluble dans l'eau. C'est une molécule très polaire, sa grande polarité rend difficile son extraction [22, 51, 147, 159].

La metformine hydrochloride est un sel d'une base diacide ayant une grande constante de dissociation. Par ses deux sites de protonation, la metformine reçoit un seul HCl dans le 1^{er} car le 2^{ème} est protoné par formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Il s'agit d'un monosel [51].

A température ambiante, la metformine hydrochloride résiste à l'action des acides minéraux, donc pour pouvoir effectuer une telle réaction il faut chauffer le milieu réactionnel. Sous l'action de la soude 1N bouillante, pendant 30 minutes, une disparition de la metformine est observée avec détection par HPLC des molécules de du Biuret, diméthylurée et de guanylurée qui sont des produits de dégradation [51].

L'action des oxydants tel que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ a produit des molécules de Biuret, diméthylurée, guanylurée et mélamine (l'impureté D). De plus, la décomposition de la metformine est rapide avec émission de vapeurs toxiques des oxydes nitriques [02, 51].

Les caractéristiques physico-chimiques de la metformine hydrochloride sont résumées dans le *Tableau -1*-ci-dessous :

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques de la metformine hydrochloride
[02, 13, 27, 51, 124, 159]

Nomenclature	Nom chimique	N,N-diméthylimidodicarbonimidique diamide Hydrochloride
	Nom IUPAC	Chlorhydrate de 1,1-Dimethylbiguanide
Propriétés Chimiques	Formule chimique	C ₄ H ₁₁ N ₅ ,HCl ou C ₄ H ₁₂ ClN ₅
	PM	165.625 g/mol
	pKa	Pka ₁ = 2,77 Pka ₂ = 11,52
Propriétés physiques	Aspect physique	Poudre cristalline blanche hygroscopique avec un goût amer
	Absorbance dans l'UV	232 nm
	Point de fusion	222-226°C
	Polarité	LogP _{octanol :eau} = -2,64
	Solubilité	Soluble dans l'eau, l'éthanol 96° Insoluble dans l'acétone et le chlorure de méthylène

II- Synthèse chimique :

Un biguanide est constitué de deux guanides jointifs, le nom ‘‘biguanide’’ a été donné par Rathke en **1879** quand il a obtenu un composé neuf après réaction de condensation de trichlorure de thio-urée et de phosphore avec de la guanidine. Cette synthèse a été améliorée ultérieurement à l’aide d’une réaction de condensation à 110° du cyanoguanidine avec une solution ammoniacque de sulfate cuprique, dans un tube scellé. En **1892** les biguanides ont été obtenu par fusion directe du chlorure d’ammonium avec de la cyanoguanidine à 195° pendant quelques minutes, cette réaction est encore utilisée pour la synthèse des biguanides substituées [131, 179].

La première synthèse chimique du diméthylbiguanide remonte à l’an **1922** et est attribuée à Werner et Bell de *Trinity college, Dublin, Irlande* [129, 154].

La metformine (N,N-diméthylimidodicarbonimidique diamide Hydrochloride) est habituellement synthétisée par une réaction entre diméthylamine hydrochloride et dicyanodiamide à une température de 120-140°C pendant 4 heures avec un rendement de 69% [143].

La synthèse est schématisée dans la **Figure-5-** :

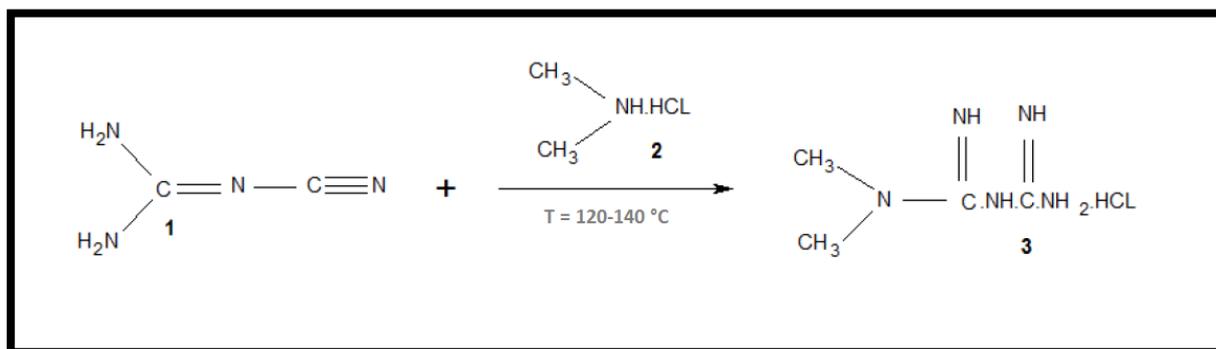


Figure 5: Réaction de synthèse chimique de la metformine. [143]

Avec :

- 1** : Dicyanodiamide
- 2** : Diméthylamine hydrochloride
- 3** : Metformine hydrochloride

III- Propriétés pharmacologiques et mécanisme d’action:

III-1- Pharmacocinétique :

La metformine hydrochloride est absorbée dans l’intestin grêle mais uniquement 70% de la dose orale administrée est absorbée en presque 6h, en conséquence, la reprise fécale d’une dose orale est de 30%. Du fait de sa bonne solubilité à pH entre 1 et 7.5, cette molécule appartient à la 3ème classe de BCS (*Biopharmaceutical Classification System*): haute solubilité faible absorption (*High water solubility low permeability*) [111, 131, 167].

La metformine est très soluble dans l’eau et a une faible absorption intestinale. La metformine est le substrat de plusieurs transporteurs poly-spécifiques appelés OCT (*Organic Cation Transporters*) impliqués dans son absorption, sa distribution et son élimination [126, 134].

Sa biodisponibilité est de 50 à 60% et le pic plasmatique est atteint après deux heures et demi (2,5) heures de prise. La différence entre la quantité absorbée et la quantité bio-disponible peut être expliquée par l'adhésion de la molécule à la paroi intestinale. La prise de l'alimentation en même temps que la metformine peut altérer son absorption. La concentration plasmatique peut arriver jusqu'à 2 µg/ml une à deux heures après l'administration d'une dose de 500 à 1000 mg. Pendant les essais cliniques contrôlés, la concentration plasmatique maximale n'a pas dépassé 5 µg/ml même à doses très élevées. Sa demi vie ($t_{1/2}$) d'absorption est entre 0,9 et 2,6 h [113,123,131].

C'est une molécule assez stable, de ce fait sa liaison aux protéines plasmatique est négligeable. Elle a une diffusion très importante dans les globules rouges et une faible diffusion membranaire [126, 131].

La metformine se trouve sous forme de cation à pH physiologique. Le volume de distribution (Vd) de la metformine est de 63-276 litres. Son entrée hépatique est assurée par les OCT-1 [120, 153].

Éliminée telle qu'elle est au niveau rénal, la metformine n'est pas métabolisée au niveau hépatique. Sa clairance rénale est supérieure à 400 mL/min avec un $t_{1/2}$ d'élimination égale à 6.5h. Du fait qu'elle soit éliminée sous forme inchangée et que sa demi-vie soit élevée, sa posologie est adaptée en fonction du débit de filtration glomérulaire (DFG) chez les patients présentant une insuffisance rénale [183].

III-2- Pharmacodynamie et Mécanisme d'action :

La metformine est un antidiabétique oral normoglycémiant [53]. Chimiquement et pharmacologiquement, la metformine n'est liée à aucune autre classe d'antidiabétiques oraux [131,144]. La metformine a une action antihyperglycémiant extra-pancréatique [17,58, 108].

C'est un sensibilisateur à l'insuline qui diminue la résistance périphérique à son action et la potentialise sans stimuler sa sécrétion. Elle agit en présence d'insuline [32, 53,75 ,127].

Au niveau intestinal elle ralentit l'absorption du glucose et augmente son utilisation *in situ* [21, 95,130].

Au niveau hépatique, elle diminue la production du glucose en inhibant la néoglucogenèse et glycogénolyse. La metformine augmente l'utilisation du glucose périphérique par action membranaire elle favorise son entrée au niveau musculaire [17,66 ,75, 140].

- Action sur le métabolisme glucidique :

La metformine est un inhibiteur du complexe-1 (C-1) de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette inhibition altère la balance énergétique cellulaire en réduisant la disponibilité en Adénosine Triphosphate (ATP) et en augmentant l'Adénosine Mono-Phosphate (AMP) cellulaires. L'AMP étant un inhibiteur allostérique de la fructose-1,6-bisphosphatase, l'enzyme clé dans la néoglucogenèse, va diminuer la production du glucose hépatique par son augmentation [102,110].

- Action sur le métabolisme lipidique :

L'augmentation de la charge énergétique (définie par un rapport AMP/ATP supérieur à 1) conduit à l'activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) menant à une réduction de la lipotoxicité, ainsi la metformine aide à la perte de poids et diminue les Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Low Density Lipoprotein (LDL) et triglycérides, et à une amélioration de

la sensibilité à l'insuline permettant ainsi de rétablir le contrôle de la gluconéogenèse [110, 120,131, 149].

Le mécanisme d'action de la metformine est illustré dans la **Figure-6-** qui schématise le mécanisme d'action antidiabétique de la Metformine

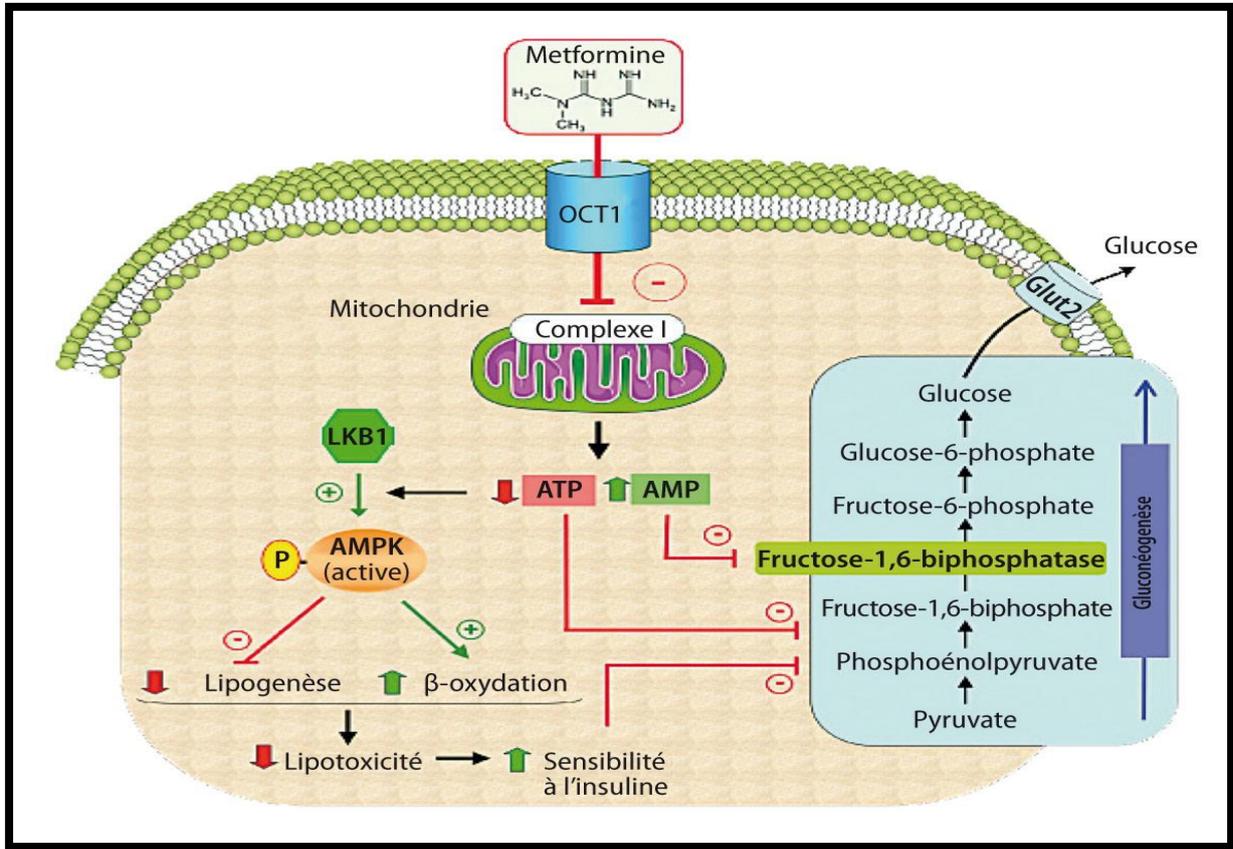


Figure 6: Mécanisme d'action de la metformine au niveau hépatique [153]

D'autres actions ont été démontrées dernièrement, parmi lesquelles on trouve l'action Antinéoplasique sur la protéine m-TORC1 (Mammelon Target of Rapamycin complexe-1), inhibiteur de migration des cellules cancéreuses, ce m-TORC1 inhibe aussi l'expression de la matrix metalloproneinase-9 (MMP-9) par la suppression de l'activation de l'activateur de transcription de protéine -1 (AP-1) [118, 120, 176]

La particularité de la metformine est qu'elle n'induit pas une hypoglycémie ni prise de poids, mais elle peut être responsable d'une acidose lactique gravissime [53, 75].

IV- Indications de la metformine hydrochloride :

La metformine est le traitement de première intention dans le diabète type 2 non compliqué autrefois appelé diabète non insulino-dépendant , du fait de son coût bas et de son efficacité. Le diabète sucré touche actuellement plus de 425 millions personnes dans le monde. L'indication de la metformine hydrochloride se fait en particulier en cas de surcharge pondérale, lorsque le régime alimentaire et l'exercice physique ne sont pas suffisants pour rétablir l'équilibre glycémique. La balance bénéfice/risque est favorable chez la plupart des personnes avec des effets indésirables maitrisables [75, 146, 164,169]

Le diabète sucré est défini comme maladie marquée par une hyperglycémie pathologique dont les conséquences se font sentir à long terme. Sa valeur à jeun est supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/l) et supérieure à 2 g/L (11 mmol/L) en postprandial, confirmée à deux reprises [36, 58].

Cette hyperglycémie est chronique, elle est causée par une sécrétion diminuée de l'insuline (la seule hormone hypoglycémiant qui contrôle le métabolisme glucidique), ou par la diminution de son efficacité. Dans la quasi-totalité des cas sa cause est inconnue [19, 22].

On distingue deux types de diabète sucré :

- **le diabète de type 1 :**

Ou juvénile, anciennement appelé diabète insulino-dépendant (DID), est la conséquence d'une destruction auto-immune des cellules des îlots de Langerhans. Il s'installe brutalement avant l'âge de 20 ans. Son traitement vise à administrer de l'insuline à raison d'environ 40 unités/jour [53, 21].

- **le diabète type 2 :**

Anciennement dénommé diabète non-insulino-dépendant (DNID), caractérisé par une résistance vis-à-vis de l'insuline. Il s'installe discrètement par un épisode hyper-insulinémique puis hypo-insulinémique. Son diagnostic se fait lors d'un dépistage ou au stade des complications essentiellement après l'âge de 40 ans. Son traitement se fait par l'administration des ADO seuls, ou associés à l'insuline [21].

Chez l'adulte la metformine hydrochloride peut être utilisée seule ou en association avec d'autres ADO (avec les sulfonylurées surtout) ou avec l'insuline. En revanche, Chez l'enfant, elle ne peut être utilisée en association avec les ADO, seule l'association avec l'insuline est possible [21, 36]

Généralement, sa posologie est entre 400 mg et 1300 mg/j en 2 à 3 prises, on peut aller jusqu'à 2000 mg si nécessaire [36].

Une fois un diabète de type 2 est diagnostiqué, le premier geste thérapeutique à effectuer est la prise des mesures hygiéno-diététiques associés à des activités physique, cela est nécessaire à l'amélioration, voire le rétablissement d'un équilibre glycémique, ces recommandations sont supportées par de bonnes données scientifiques (Grade A). Si l'objectif glycémique n'est pas atteint, un traitement ADO est instauré [183].

La metformine hydrochloride est recommandée en premier lieu, en se basant sur des données scientifiques assez bonnes (Grade B). En cas d'échec thérapeutique après 6 mois de traitement, on passe à prescrire deux ADO (Bithérapie), souvent l'hydrochloride de metformine est associé à un sulfamide hypoglycémiant. La **Figure-8-** représente un schéma thérapeutique proposé par le Vidal 2018 pour la prise en charge du diabète de type 2 [21, 183].

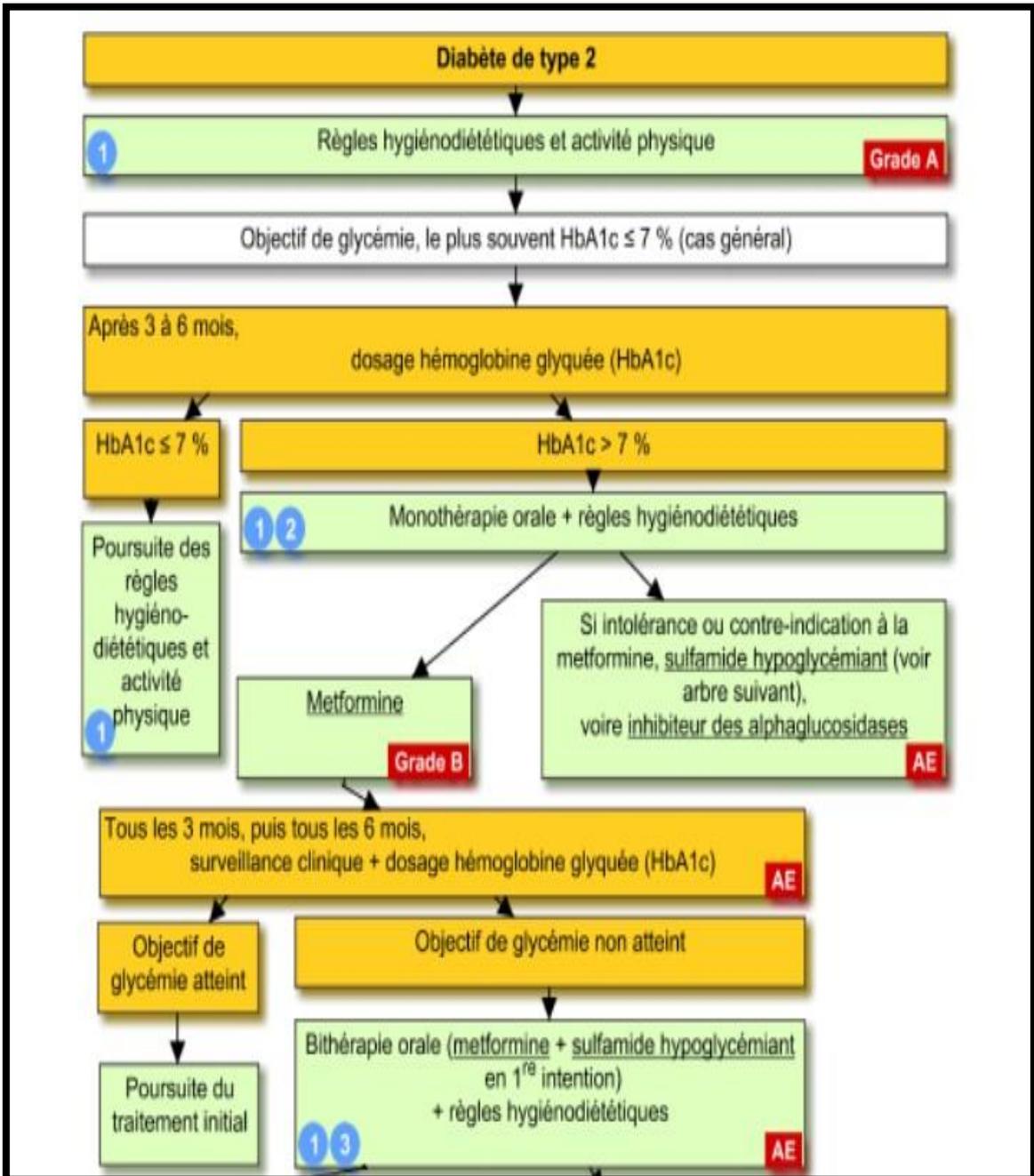


Figure 7 : La prise en charge du diabète type 2 [183]

La metformine hydrochloride a d'autres indications en cours d'évaluation : le traitement des ovaires polykystiques, du diabète gestationnel et le cancer [98, 102, 103]

V- Effets indésirables et Précautions d'emploi de la metformine Hydrochloride :

Des effets indésirables sont observés lors du traitement par la metformine. Les troubles digestifs sont les plus fréquents surtout en début de traitement et ils sont doses dépendants : des crampes abdominales, des nausées et des vomissements, en plus, la metformine est la première cause de diarrhées chez un diabétique. Pour pallier à ces troubles, il est préférable de la prendre au milieu des repas ou après [53,66, 75, 183].

La metformine peut être responsable d'une diminution de l'absorption de la vitamine B12, qui risque d'engendrer une anémie macrocytaire, des neuropathies et des troubles cognitifs. Une supplémentation en vitamine B12 est parfois nécessaire [80, 105].

Une acidose lactique rare, exceptionnelle et parfois mortelle (2 à 9 pour 100000 patients par an) peut survenir au traitement par la metformine. Il s'agit d'une élévation du taux plasmatique des lactates au-delà de la valeur normale qui est de 1 à 1,7 mmol/L, cet effet indésirable survient suite à l'accumulation de la metformine dans le cas d'une insuffisance rénale, et de toute situation responsable d'hypoxie tissulaire [77, 99, 106, 131, 157].

Les premiers signes de l'acidose lactique sont des crampes abdominales et une asthénie, qui nécessitent l'arrêt immédiat du traitement et un ionogramme d'urgence avec le dosage de lactates. Cette situation peut être prévenue par un contrôle régulier de la créatinine. La prise d'alcool peut majorer l'acidose lactique causée par cette molécule [71, 75].

Le traitement par la metformine exige certaines précautions. Le contrôle de la créatininémie doit se faire régulièrement, surtout chez les personnes âgées [183]. Quand le DFG est inférieur à 30 mL/min, la metformine hydrochloride est contre indiquée (**Tableau-2**).

Tableau 2 : Adaptation de la posologie de l'hydrochloride de metformine en fonction du DFG [183].

DFG (ml/min)	Dose journalière totale maximale (à répartir en 2 à 3 prises quotidiennes) (mg)	Autres éléments à prendre en compte
60-89	3 000	Une diminution de la dose peut être envisagée selon la détérioration de la fonction rénale
45-59	2 000	Les facteurs susceptibles d'augmenter le risque d'une acidose lactique doivent être passés en revue avant d'envisager l'instauration de la metformine. La dose d'initiation ne peut dépasser la moitié de la dose maximale.
30-44	1 000	
<30	-	La metformine est contre-indiquée

VI- Formes galéniques de la metformine hydrochloride :

La metformine est un *médicament* commercialisé en Algérie sous forme de *comprimés pelliculés*.

- **Définitions :**

“Un médicament tel qu’il est présenté au malade est constitué par un ou plusieurs principe(s) actif(s), des excipients ou substances auxiliaires et des articles de conditionnements” [52].

Les comprimés sont des préparations médicamenteuses solides contenant une unité de prise d’un ou de plusieurs principes actifs [86]. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules. Les comprimés enrobés sont des comprimés dont la surface est recouverte d’une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses comme résines, gomme, gélatine, sucre, substance plastifiantes, cires, polyols, colorants [12, 52].

L’enrobage se fait via deux procédés : dragéification et pelliculage. Dans le pelliculage les comprimés sont enrobés par des substances filmogènes comme des dérivés de cellulose ou des macrogols. Ce procédé est réalisé souvent en suspension dans l’air. Il s’agit d’une méthode rapide, moins chère et automatisable, qui permet d’obtenir des comprimés moins gros qu’avec la dragéification, et où les rainures de sécabilité restent visibles [58].

La metformine peut être seule dans sa forme galénique [107,111,155,165] ou en association¹. Elle existe en comprimés, formes retards ou des injections [111,134,158]

Quatre dosages sont disponibles dans la forme comprimée : 1000, 850, 700 et 500 mg. Partout dans le monde, la metformine existe sous plusieurs sels : chlorhydrate, embonate, chlorophénoxyacétate [75,122].

En Algérie, il existe plus de 30 spécialités commercialisées de comprimés de metformine hydrochloride à différents dosages : de 500 mg, 850 mg et 1000 mg, dont un princeps fabriqué sous licence [173].

¹ Il existe plusieurs associations de metformine avec d'autres PA : [125, 132, 137, 139, 148, 151, 157, 161, 162, 163]

CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER

Dans ce chapitre on s'intéresse à décrire brièvement les méthodes à comparer ultérieurement dans la partie pratique : la spectroscopie couplée à l'UV et la chromatographie liquide haute-performance couplé UV.

I- La spectroscopie UV :

Tout au début, le terme spectroscopie désignait une branche scientifique où le rayonnement visible était décomposé selon différentes longueurs d'onde. Par la suite, d'autres types de rayonnements électromagnétiques se sont inclus tels que les rayons X, le rayonnement UV, le rayonnement IR, les micro-ondes et les ondes radio (**Figure-8-**). Ce sont des manifestations moins évidentes par rapport à celles observées dans le domaine du visible. A ces méthodes, sont ajoutées d'autres n'impliquant pas de rayonnement électromagnétique [78].

La spectroscopie UV fait partie des méthodes instrumentales spectroscopiques optiques, au même titre que les méthodes basées sur le rayonnement visible et infrarouge. Elle s'étend sur un intervalle allant de 185 à 400 nm. L'unité dans le domaine de l'UV est le nanomètre (nm) dont 1 nm est égal à 10^{-9} m [78, 83].

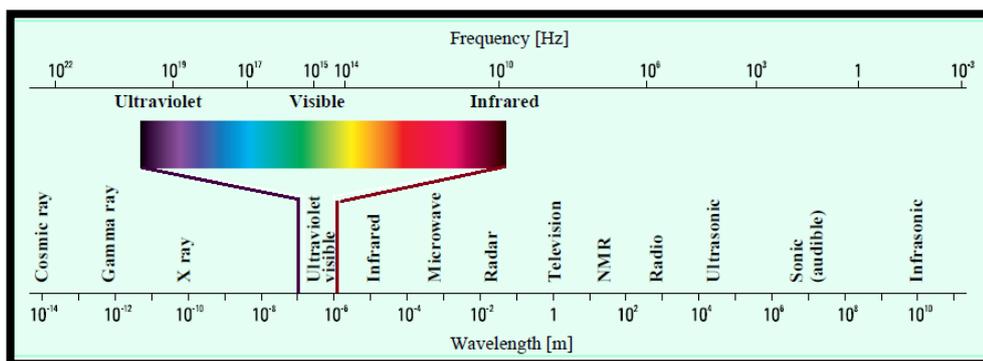


Figure 8 : Schéma du domaine spectral de l'UV-visible [70].

I-1- Principe de la spectroscopie UV-vis :

L'analyse spectroscopique est fondée sur les interactions entre la matière et une radiation électromagnétique. Une radiation lumineuse est constituée de deux composantes perpendiculaires : un vecteur champ magnétique et un vecteur champ électrique qui varient de façon sinusoïdale (**Figure-9-**), ils parcourent l'espace par un mouvement ondulatoire [40, 70].

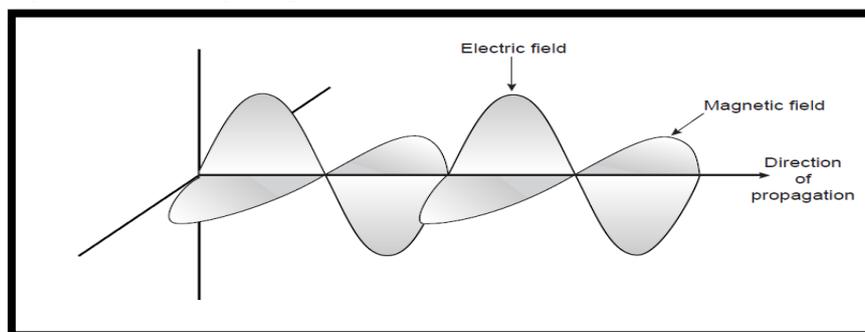


Figure 9 : Schéma explicatif d'une radiation électromagnétique montrant son champs électrique, magnétique et la direction de propagation [43].

CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER

L'absorption lumineuse résulte de l'interaction des photons de la source lumineuse avec les chromophores de la molécule. Un chromophore est un groupement fonctionnel responsable de l'absorption à une longueur d'onde donnée. En l'absence de chromophore on ne peut pas étudier l'absorbance dans l'UV-vis [43, 70, 145].

Divers chromophores existent, le **Tableau-3-** résume les chromophores les plus utilisés dans le domaine de l'UV.

Tableau 3 : Exemples de chromophores [70, 78]

Chromophore	Formule	λ_{\max} (nm)
Acétylène	RC=CR	173
Oxime	=NOH	190
Ethylène	RCH=CHR	193
Amine	-NH ₂	195
Carboxyle	R-COOH	204
Amide	R-CO-NH ₂	208
Nitro	-NO ₂	210
Nitrite	-ONO	230
Nitrate	-ONO ₂	270
Carbonyle (aldéhyde)	RHC=O	293
Nitroso	-N=O	300

Lorsqu'une molécule isolée se trouvant à son état fondamental absorbe un photon dans l'UV-vis, l'énergie correspondante est captée par un ou plusieurs électrons des liaisons σ ou π et les doublets non-liants n des atomes, ce qui est à l'origine des transitions électroniques responsables du passage à l'état excité. A cet état son énergie électrique, qui est une composante de l'énergie mécanique totale est alors modifiée [78, 83, 65].

CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER

L'énergie associée à une radiation électromagnétique est définie par l'équation :

$$E = h\nu$$

Où :

E : est l'énergie (en joules)

h : La constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ J.s) et

ν : La fréquence (en secondes)

I-2- Appareillage :

La plupart des instruments spectroscopiques utilisés dans l'analyse dans l'UV-vis sont constitués de 5 parties :

- une source stable d'énergie rayonnante ;
- un sélecteur de longueur d'ondes qui permet d'en isoler un domaine limité ;
- un ou plusieurs récipients porte-cuves ;
- un détecteur de rayonnement ;
- dispositif du traitement ou d'affichage du signal [83].

Les spectromètres sont soit de type séquentiel à optique normale où une seule longueur d'onde est envoyée, ou de type simultané à optique inverse permet une détection simultanée de plusieurs longueurs d'ondes. Les spectromètres couramment utilisés vont généralement de 185 à 900 nm (*Figure-10-*) [78].

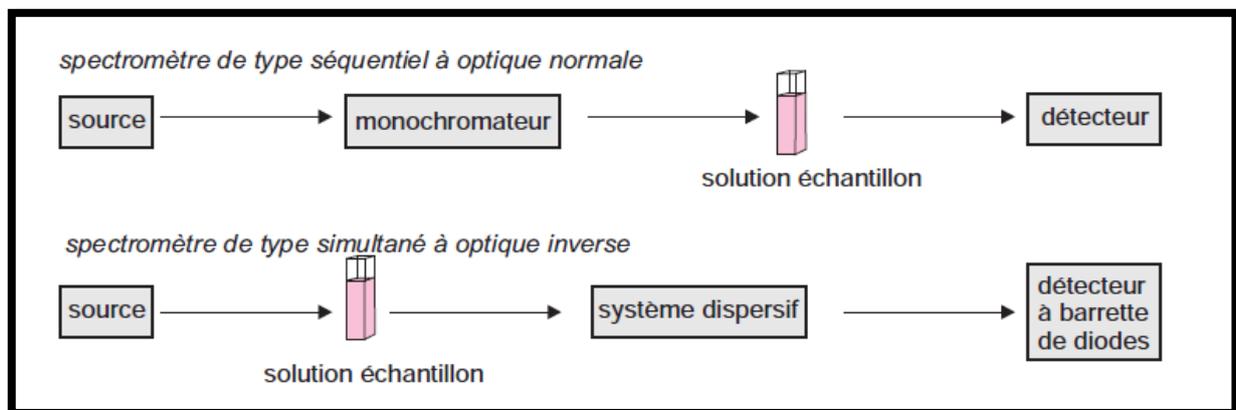


Figure 10 : Les types de spectromètres : instruments dans l'UV-visible [78]

I-2-1- Sources de radiations électromagnétiques :

Les sources de radiations électromagnétiques doivent être à la fois stables et intenses dans la région d'analyse voulue. Ces sources sont classées en sources continues émettant des rayonnements de toutes les longueurs d'onde de la région spectrale où elles sont utilisées (**Tableau-4-**), et en sources à spectre de raies qui émettent par contre des bandes très étroites dont les longueurs sont connues avec exactitude (exemple : lampe à Mercure (Hg) pour l'absorption à la longueur d'onde 254 nm). La combinaison de deux sources s'avère intéressante pour couvrir un large intervalle allant du proche UV au visible [43, 78, 83].

Tableau 4: Exemples de sources continues [43].

CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER

Source	Région	Domaine d'utilisation
Lampe à H ₂ , à D ₂	160 à 380 nm	Absorption dans l'UV
Lampe à tungstène	320 à 2400 nm	Absorption dans le visible
Lampe à arc Xénon	200 à 1000 nm	Fluorescence

I-2-2- Sélecteurs de longueurs d'onde :

Les appareils de spectroscopie sont munis d'un sélecteur de longueur d'onde qui ne permet que le passage de la bande absorbée par le composé à analyser. Il existe deux types de sélecteurs : les monochromateurs qui peuvent faire varier la longueur d'onde de façon continue sur un large domaine spectral, et les filtres avantageux par leur simplicité, robustesse et leur faible coût. En pratique, plus la bande passante est étroite, plus les écarts de la loi de Beer-Lambert sont faibles. Les appareils simultanés n'ont pas de monochromateurs mais un système dispersif placé après le compartiment de l'échantillon pour diffracter les radiations transmises. [78, 83].

I-2-3- Cuve :

Le récipient contenant l'échantillon est une cuve de 1 cm généralement, faite du quartz qui n'absorbe pas dans la région de l'UV-visible [78].

I-2-4- Détecteur :

Le détecteur transforme l'énergie rayonnante en un signal électrique mesurable. Il doit être sensible, avec une réponse linéaire sur un intervalle élargi et ayant un faible bruit de fond. Parmi les types de détecteurs existants les photomultiplicateurs et les photodiodes sont les plus utilisés. L'association de plusieurs détecteurs photodiodes a permis de mettre au point la barrette de diode qui caractérise les appareils simultanés [70, 78, 83].

I-2-5- Dispositif du traitement de signal :

Le dispositif du traitement reçoit le signal électrique généré par le détecteur, le traite pour l'afficher par la suite d'une façon convenable à l'analyste. Il peut être utilisé pour calibrer la réponse du détecteur, amplifier le signal reçu, éliminer les composantes indésirables en les filtrant ou effectuer des opérations mathématiques [43, 83].

I-3- Aspects qualitatif et quantitatif de la spectroscopie UV-visible :

I-3-1- Aspect qualitatif de la spectroscopie-UV:

La spectroscopie UV-vis peut être une méthode qualitative, elle est généralement utilisée pour l'identification des substances à partir de la comparaison de leurs spectres d'absorption avec les spectres de référence correspondants. Quoiqu'elle ne permette pas une identification absolue, elle peut être utilisée pour confirmer l'identité des substances analysées [70, 78].

I-3-2- Aspect quantitatif :

La spectroscopie UV-vis est une méthode quantitative. Elle permet un dosage direct ou indirect (après une réaction colorée appropriée) [29].

La concentration est déterminée par la mesure de l'atténuation de l'énergie émise par la source lumineuse. Cette atténuation, appelée transmittance (T) est donnée par l'équation :

CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Où :

I_0 : est la lumière incidente

I : est la lumière transmise

La transmittance est le résultat de l'absorption d'une quantité d'énergie par l'analyte à doser. D'ici, l'absorbance A a été défini comme suit :

$$A = -\log T$$

La loi de Beer-Lambert définie ainsi une relation proportionnelle entre la concentration et l'absorption [62], elle est comme suit :

$$A = \epsilon lc$$

Où :

A : désigne l'absorbance, c 'est un paramètre optique sans dimension.

ϵ : est le coefficient d'absorption molaire (ou extinction) ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et λ la longueur d'onde à laquelle on a effectué la mesure.

l : l'épaisseur de la solution traversée (en cm) fixée généralement à 1 cm.

c : la concentration molaire [74, 78].

I-4- Applications dans le domaine de l'industrie pharmaceutique :

La spectroscopie d'absorption de l'UV et du visible est largement utilisée dans le contrôle-qualité des produits pharmaceutiques. Ses applications sont nombreuses et la littérature est assez riche. Elle peut être utilisée pour les dosages de routine pour quantifier les substances actifs et les excipients à condition qu'ils absorbent dans l'UV, à l'identification et détermination des structures surtout celles ayant des bandes d'absorption assez fines et dans le contrôle de pureté via le calcul du coefficient d'extinction qui reflète la pureté d'un composé quand il est à son maximum. L'analyse des mélanges est aussi possible [40, 78].

I-5- Les limites de la spectroscopie UV :

De manière générale la spectroscopie UV apporte peu d'informations structurales, elle est peu précise et d'autres techniques sont plus performantes, il est de même pour les composés à analyser que leurs maximums d'absorption ne correspondent pas à des bandes larges. Pour les composés ayant des longueurs d'onde d'absorption proches : la grande masquera l'autre. L'analyse en dessous de 185 nm est assez délicate car l'oxygène O_2 et l'air absorbent de manière intense [40, 78].

II- La chromatographie liquide haute-performance :

II-1- Historique de la chromatographie liquide :

La chromatographie est un terme général qui englobe une large variété de techniques de séparation, toutes sont basées sur le principe de partage d'une substance à analyser entre une phase mobile pouvant être liquide, gaz ou un fluide supercritique, et une phase stationnaire qui peut être soit de nature liquide ou solide.

La découverte de la chromatographie est attribuée au botaniste russe Mikhail Tswett [48, 88,109, 166]. Dans sa publication, en 1906, il décrit son travail qui consistait en la séparation des pigments végétaux dans une colonne en verre remplie de carbonate de calcium (CaCO_4) finement divisée et il donna à la méthode l'appellation de « méthode Chromatographique » :

« Comme les radiations lumineuses dans le spectre, les différents composants d'un mélange de pigments, obéissant à une loi, se trouvent séparés sur la colonne de carbonate de calcium et peuvent ensuite être déterminés qualitativement et quantitativement. J'appelle une telle préparation un chromatogramme et la méthode correspondante la méthode chromatographique ».

La méthode s'est développée suite à des innovations telles que la chromatographie de partage et sur papier dans les années 1940, la chromatographie en phase gazeuse au cours des années 1950, la chromatographie d'exclusion stérique dans le début des années 1960. Et puis en 1969 le journal « *Gas Chromatography* » a changé son nom en « *The journal of chromatographic science* » ce qui a reflété l'intérêt porté à la chromatographie liquide (CL). Cela a ouvert les portes à la CL moderne [48, 68].

D'après la 9^{ème} édition de la pharmacopée européenne :

“La chromatographie liquide (CL) est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire” [02].

Toutes les techniques de séparation de la chromatographie liquide ont en commun la nature liquide de la phase mobile [23].

Dans le 5^{ème} symposium sur ‘‘*Advances in chromatography*’’ à Miami en 1969 une session spéciale sur HPLC est organisée, des compagnies ont présentées des instruments pour HPLC et ce meeting était la percée de l'HPLC. Le mérite du développement de la chromatographie liquide à haute performance revient au professeur Horvath en 1970. L'HPLC est la chromatographie liquide la plus utilisée, c'est une technique de chromatographie sur colonne dont la performance en termes de sélectivité et résolution se sont grandement améliorés par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées [47, 78, 109].

La chromatographie liquide à haute pression est souvent appelée chromatographie liquide haute-performance (les deux ont comme abréviation HPLC) car elle offre une performance meilleure que la chromatographie liquide classique [09].

II-2- Principe de HPLC :

L'HPLC est une méthode de séparation physique [30, 60]. Sous des conditions optimales, chaque constituant d'un composé interagit différemment avec deux phases non miscibles : l'une dite stationnaire (PS) finement divisée et emprisonnée dans une colonne, et l'autre dite mobile (PM) ou éluant, de nature liquide [16, 78, 90].

La séparation chromatographique passe par trois étapes essentielles : injection, séparation proprement dite et élution. Quand un composé est injecté dans la colonne de CL, une bande étroite est formée à l'extrémité supérieure de la colonne. La migration des composants à travers la PS est le résultat des forces opposées des mouvements d'entraînement par la PM et la retardation par la PS. Ainsi, chaque composant est entraîné par la PM et retenu par la PS. La mise en contact du composé avec les deux phases PS et PM, fait apparaître un phénomène de distribution, responsable de l'apparition des équilibres de concentrations. Par conséquent, ce composé se sépare en ses divers constituants. [16, 78]

II-3- Appareillage de HPLC :

Un appareil HPLC est un ensemble de compartiments sophistiqués lui conférant une facilité de l'automatisation et une flexibilité d'emploi. La conception des différents systèmes HPLC est en gros la même, seules leurs spécifications et leurs tailles diffèrent. Il s'agit de modules spécialisés dans des boîtiers distincts ou intégrés pour minimiser l'encombrement, ils sont liés entre eux par des canalisations permettant la circulation de la phase mobile faites en matières qui n'interagit pas avec elle, de plus, elles doivent résister à la chaleur et aux grandes pressions [23, 41, 78].

La Figure -11- montre la composition générale d'un appareil de HPLC. Il est fait de :

- Réservoirs de phase mobile liés à un dégazeur
- Une pompe
- Un injecteur
- Une colonne thermostatée
- Un détecteur lié au micro-ordinateur doté de logiciels traitant les résultats.

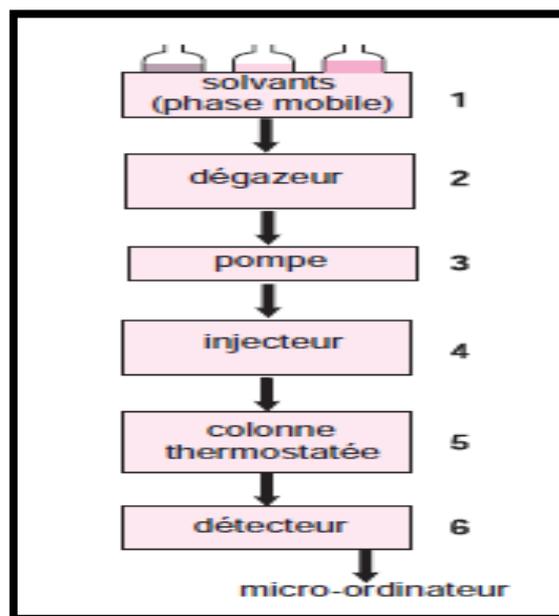


Figure 11 :Schéma d'une installation HPLC [78]

II-3-1- La phase mobile :

Ou l'éluant, est le solvant qui entraîne le soluté à travers la colonne. En HPLC, la phase mobile interagit avec la phase stationnaire fixée sur la colonne et avec le soluté et elle a de ce fait, une influence sur la rétention du soluté et la séparation [78]

Le choix du solvant lors du développement d'une méthode HPLC a une grande importance. Trois facteurs liés au solvant sont à prendre en considération :

- Propriétés physiques
- Propriétés chimiques, surtout en termes de respect de la compatibilité du système et les aspects de sécurité ;
- L'impact de ces propriétés physico-chimiques sur l'analyse [79].

Le solvant idéal en HPLC doit avoir certaines spécifications. Il doit être non corrosif au système, solubilise le soluté, pure et n'absorbe pas dans le domaine de l'analyse souhaitée, de préférence : non toxique et non inflammable [30].

II-3-2- La pompe :

Les pompes usuelles ont un débit allant de 0,001 à 10 mL, qui convient aux analyses pharmaceutiques qui se font souvent à des débits entre 1 et 3 mL. La pompe doit avoir le minimum de fluctuations pour garantir la stabilité du détecteur et la reproductibilité de la rétention. Un appareil HPLC peut contenir une ou plusieurs pompes, associées à une chambre de mélange. Elle force l'éluant à traverser la colonne suivant un mode isocratique à composition fixe ou au contraire à composition variable pour faire un gradient d'élution. Les pompes peuvent être à pression constante ou à débit constant. L'utilisation des pompes à débit constant s'est avérée plus intéressante, du fait qu'elles s'adaptent aux variations de la résistance de la colonne et de la viscosité de la PM, aussi la plupart des détecteurs mesurent la concentration en fonction du temps, ce qui élimine la variance de l'analyse [09, 22, 24, 78].

II-3-3- L'injecteur :

Le volume maximal à introduire dépend du volume de l'échantillon dans la boucle d'injection. Une bonne reproductibilité est garantie par l'injection automatisable d'un petit volume d'échantillon tandis que l'injection manuelle dépend de l'expérience de l'opérateur. Le plus petit volume injectable est de 1 μ L [41].

II-3-4- Colonne :

La colonne est le cœur de toute séparation chromatographique, l'utilisation d'une colonne HPLC stable est nécessaire pour la robustesse et la reproductibilité de la méthode [42, 84].

Il s'agit de tubes, souvent en acier inoxydable ou en verre. Elles font 10 à 30 cm de longueur et 4,5 à 5 mm de diamètre interne. Les matériaux qui constituent la colonne doivent être inertes et capable de résister à la pression que nécessite la méthode [18, 22, 68].

II-3-5- La phase stationnaire :

La phase stationnaire est contenue dans la colonne. La chromatographie en phase normal consiste en l'interaction entre le soluté et la PS polaire, qui sera importante lors de l'emploi d'un éluant apolaire. Suite à de nombreuses complications, la chromatographie à phase inversée (RP) a été développée par le greffage de groupements apolaires. La plupart des séparations de molécules polaires ou à faible poids moléculaire se font par chromatographie-RP [28, 38].

II-3-6- Détecteur :

Le détecteur est considéré comme l'élément d'HPLC le plus important après la colonne. Ce n'est guère intéressant dans une analyse de séparer des composants sans pouvoir les identifier [25].

Différents types de détecteurs existent. Le détecteur dans l'UV est très utilisé en LC [34]. Il mesure les variations de l'absorbance dans l'UV résultant du passage de l'analyte qui contient des chromophores absorbants dans ce domaine. La longueur d'onde est choisie de manière à augmenter la sensibilité et la spécificité pour le composé à analyser [16, 63,85].

Le détecteur est lié à un micro-ordinateur qui s'occupe de l'enregistrement des résultats et de leur traitement par des logiciels appropriés.

II-4- Le tracé chromatographique ou Chromatogramme :

Le chromatogramme (*Figure-12-*) est un graphique d'une fonction de concentration en soluté en fonction du temps d'élution ou rarement du volume d'élution [18], il montre les variations de la composition de la phase mobile et il est obtenu par un capteur placé en aval de la colonne. Les pics qui apparaissent sur le chromatogramme représentent la réponse du détecteur aux composants élués après sa conversion en un signal électrique [12, 72]. Le chromatogramme est utilisé à la fois dans l'analyse qualitative et quantitative [83].

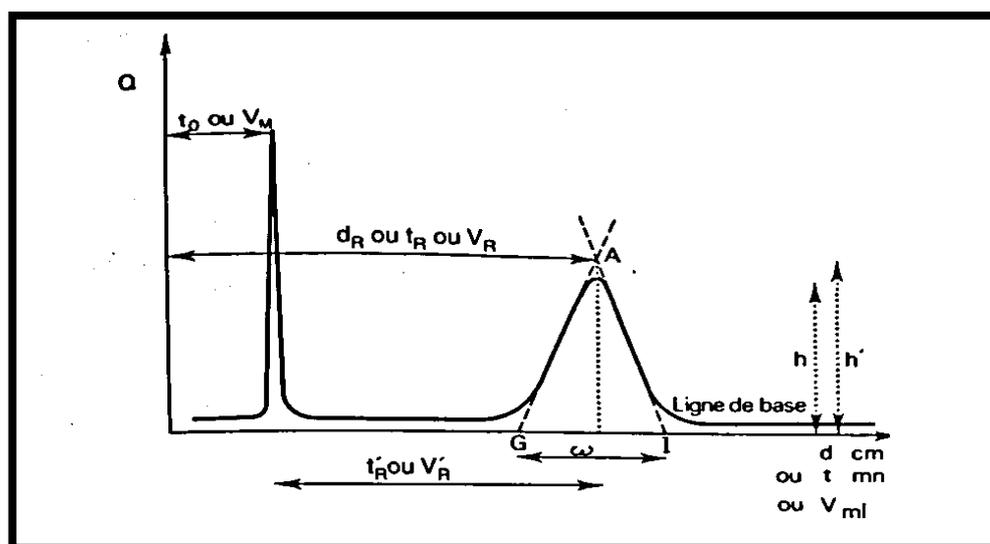


Figure 12 : Chromatogramme [40]

Cette courbe traduit la variation d'un paramètre relié à la concentration d'un soluté en fonction du temps, du volume ou de la distance. En ordonnées on a l'intensité du signal de détection, et en abscisse on a le temps de rétention ou rarement le volume de rétention.

CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER

Le pic idéal est de type Gaussien (**Figure-12-**). L'aire d'un pic (A_i) bien résolu est définie comme l'intégral de la réponse du signal, du début jusqu'à la fin du pic. La hauteur du pic (h) représente la distance entre la ligne de bas et le sommet du pic [84]

La distance de rétention (d_R) est la distance entre le début de la chromatographie et le maximum du pic [40, 56].

Le volume de rétention (V_R) représente le volume de la PM nécessaire à l'entraînement d'une concentration maximale d'un soluté.

Le temps de rétention (t_R) est le temps que met un soluté pour traverser la colonne chromatographique, autrement dit, c'est le temps entre l'injection d'un échantillon et le maximum de son pic qui apparaît au détecteur. L'intervalle de temps avant qu'un pic apparaisse est appelé temps mort (t_M) [83]. (**Figure-13-**).

La différence entre t_R et t_M est dite temps de rétention réduit t_R' . Le t_R dépend de la nature des phases mobile et stationnaire, la température et la longueur de la colonne ainsi que du gradient de pression [18].

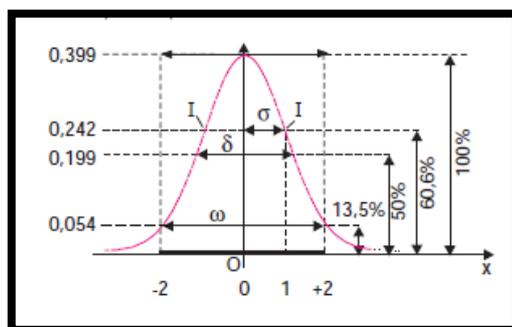


Figure 13 : Caractéristiques du pic idéal [78]

Où :

δ : désigne la largeur à mi-hauteur (50%) .

σ : Ecart type la moitié de largeur du pic entre les deux points d'inflexion, à 60.6%,

σ^2 : variance du pic.

ω : est la largeur « à la base » du pic, mesurée à 13,5 % de la hauteur [78].

Ces quatre (4) paramètres majeurs sont souvent utilisés pour définir les caractéristiques du système chromatographique, de la colonne et de la séparation en elle-même.

II-4-1- Le facteur de rétention K' ou capacité :

C'est une mesure de la rétention d'un soluté dans un système chromatographique particulier, sous des conditions chromatographique données. C'est un facteur indépendant des dimensions de la colonne et du débit de la phase mobile, mais affecté par toutes les autres conditions chromatographiques [47, 48].

C'est le rapport entre la masse du soluté dans la PS et PM. Il est donné par la relation :

$$K' = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER

Avec K la constante de NERNST définie par le rapport des concentrations entre PS et PM. La capacité de rétention est définie en régime isocratique [18, 78].

II-4-2- La sélectivité α :

Encore appelée facteur de séparation. Elle exprime la faculté d'un système chromatographique à différencier entre les différents analytes. C'est le rapport entre leurs deux temps de rétention réduit [23, 48, 50].

On a donc :

$$\alpha = \frac{t'_{R1}}{t'_{R2}} = \frac{K'_1}{K'_2} = \frac{K_1}{K_2}$$

II-4-3- Efficacité N :

Représenté par le nombre de plateaux théorique, c'est un paramètre caractéristique de la colonne, il mesure le degré de dispersion du pic dans la colonne. Elle dépend de la longueur de la colonne L [26].

Où :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

La hauteur équivalente à un plateau théorique H est par contre un paramètre indépendant de la longueur de la colonne, il désigne la longueur d'une colonne à un seul plateau [46].

$$H = \frac{L}{N}$$

Pour une meilleure efficacité de la colonne, il faut atteindre un nombre de plateaux théoriques maximal, et une Hauteur de petite valeur [68].

II-4-4- Effet de la phase mobile :

Un des paramètres les plus importants durant un processus de séparation chromatographique est le débit de la PM. Ce débit représente la vitesse d'écoulement de la PM. La relation entre le débit et l'efficacité de la colonne est décrite par la relation de Van-Deemter, où la hauteur des plateaux théoriques est en fonction de la vitesse (u) d'écoulement de la PM avec l'intervention de trois coefficients numériques expérimentaux A , B , C , ainsi l'équation de Van-Deemter est la suivante :

$$H = A + \frac{B}{u} + C\mu$$

Où :

H : Hauteur de plateau théorique.

A : coefficient de diffusion turbulente.

B : coefficient de diffusion longitudinale.

μ : vitesse d'écoulement de la phase mobile.

CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER

C : coefficient de résistance au transfert de masse [18].

II-4-5- Résolution R :

C'est une mesure quantitative du degré de séparation entre deux pics chromatographiques [24].

La résolution est définie comme suit :

$$R = \frac{t_{R2} + t_{R1}}{w_2 + w_1} , \quad [10, 47]$$

II-5- Aspects qualitatif et quantitatif de la chromatographie :

II-5-1- Aspect qualitatif :

L'HPLC est une méthode qualitative comparative. L'identification d'une substance vise à comparer son tracé chromatographique avec celui d'un témoin de référence. La méthode la plus classique est celle de comparer le T_R d'une substance à identifier avec celui d'un étalon préparé en respectant les mêmes conditions [18, 78].

II-5-2- Aspect quantitatif :

Un des points forts de l'HPLC, c'est qu'elle soit une excellente technique d'analyse quantitative. Elle peut être utilisée pour le dosage des composants majoritaires dans un composé et même ceux qui se trouvent à l'état de traces. Les détecteurs utilisés peuvent être soit des détecteurs intégraux ou différentiel, les premiers fournissent la hauteur du pic (h) tandis que les deuxièmes apportent l'aire du pic (A_i) respectivement proportionnelles à la concentration du soluté chromatographié. La détermination d'une relation entre la réponse du détecteur et la concentration de l'échantillon est désignée par l'appellation "calibration de la méthode" [84].

Il existe deux types de méthodes d'étalonnage dans une analyse quantitative de l'échantillon :

- Une méthode d'étalonnage externe : où le standard externe, est préparé séparément de l'échantillon ;
- Une méthode d'étalonnage interne : dans ce cas le standard interne est un marqueur introduit comme référence et qui a des grandeurs de rétention différentes de celles de l'échantillon, et qu'on le rajoute à l'échantillon lui-même. Elle permet d'avoir des coefficients de réponse relatifs.

Dans le cas d'un étalonnage externe, se fait une comparaison entre un chromatogramme de référence ayant une aire $A_{i\text{ref}}$ obtenue à partir d'injection d'un volume V d'une solution de référence de concentration C_{ref} , et un autres chromatogramme dont l'aire est $A_{i\text{éch}}$ résultant de l'injection du même volume V de la substance à analyser $C_{\text{éch}}$. Ces deux chromatogrammes sont acquis successivement, sans changer de conditions chromatographiques. Puisque les volumes injectés sont égaux, il y a proportionnalité entre les aires. La méthode d'étalonnage externe est la plus utilisée, du fait qu'elle fait appel aux coefficients de réponse absolus. Ses résultats sont très fiables [78, 83, 85].

Les aires obtenues dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes :

$$m_i = C_i * V$$

CHAPITRE II : THEORIE DES METHODES A COMPARER

De cette relation appliquée sur les deux chromatogrammes découle une relation caractéristique de la méthode d'étalonnage externe :

$$m_{ref} = C_{ref} * V = K \quad \text{et} \quad m_{éch} = C_{éch} * V = K$$

$$C_{éch} = C_{ref} \frac{Ai_{éch}}{Ai_{ref}}$$

II-6- Domaine d'application dans l'industrie pharmaceutique :

L'HPLC en industrie pharmaceutique a de nombreuses applications, et aucun laboratoire ne peut l'ignorer [87]. Elle peut être utilisée dans l'analyse qualitative et quantitative des matières premières et produits finis, de molécules de masses grandes et polaires, dans la séparation des substances organiques, inorganiques et biologiques, la séparation des mélanges hétérogènes ou sous forme solide par l'emploi de solvant adéquat (même ceux ayant un poids moléculaire très faible) [59, 83, 78].

Si les vitesses de séparation diffèrent on pourra recueillir les composés séparément et qui seront en solution dans la phase mobile. La maîtrise de l'ensemble des paramètres de séparation assure une bonne sélectivité, une répétabilité des analyses successives ainsi que la conservation des conditions d'analyse rend les résultats reproductibles [78].

II-7- Limites de l'HPLC :

Pour pouvoir identifier différentes substances : leurs SCR (substance chimique de référence) doivent être utilisées, avec respect des mêmes conditions de déroulement de l'analyse. De plus -et comme toutes les méthodes comparatives- cette identification n'est pas absolue. Sa mise en œuvre est assez longue et le contact PM/PS peut modifier le temps de rétention de la substance [78].

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE

La qualité tel que la définit la norme ISO est "*l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences*" [06].

Le système de gestion de la qualité (SQ) est un large concept couvrant tout ce qui peut influencer la qualité d'un produit. C'est un ensemble de dispositions prises pour assurer que le médicament soit de la qualité requise pour l'usage auquel il est destiné. Il dirige et contrôle toute organisation ayant comme objectif de fournir un produit de qualité. Ce système a été établi soigneusement avant qu'un échantillon ne soit analysé. Il prend en considération toutes les exigences de l'AMM relatives à la qualité [13, 45].

Le contrôle de qualité (CQ) fait parti du système de gestion de qualité. Tout au long du cycle de vie d'un médicament, le CQ garantit que les analyses nécessaires et appropriées sont réellement effectuées de façon cohérente et que les produits ne sont libérés que si leur qualité a été jugée satisfaisante. Il se fait à différents niveaux en utilisant des techniques élaborées et en respectant des normes [13, 91]. Différentes normes existent tel que les normes ICH (*International Conference of Harmonisation*), les normes ISO (*Organisation Internationale de Normalisation*) [5, 6, 171, 172].

Les bonnes pratiques de fabrication (BPF) s'appliquent au contrôle de qualité. Les opérations de contrôle doivent être clairement décrites, spécifiant les procédures exactes à suivre pour que les résultats soient acceptables [13].

Les méthodes analytiques décrites dans les pharmacopées sont de différentes catégories. Ils peuvent servir uniquement à l'identification : le cas de la spectroscopie infrarouge (IR) et la chromatographie sur couche mince (CCM), des méthodes destinées à la quantification et au dosage à la fois : c'est le cas des méthodes utilisées pour le contrôle des principes actifs, des excipients et des impuretés, comme la chromatographie liquide haute-performance (HPLC) et les méthodes de dosage quantitatif : comme la spectroscopie dans l'ultra-violet (UV) [01, 02, 03, 04, 117].

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour le dosage de la metformine hydrochloride : la CPG, CGL, SM, HPLC et autres [131, 150].

Dans la partie suivante, des procédures de contrôle internes de la metformine hydrochloride ont été consultées, afin de bien décrire les opérations de contrôle effectuées sur la matière première (MP), en cours de fabrication ou contrôle "*in process*" et sur le produit fini.

Le CQ est basé essentiellement sur :

- L'Analyse physico-chimique ;
- Le contrôle pharmaco-technique ;
- Le contrôle microbiologique. [82]

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE

I- Le Contrôle De la Metformine Hydrochloride Matière Première :

En plus des certificats d'analyse faits par le fournisseur, les contrôles sur MP sont primordiaux [35]:

I-1- Le contrôle physico-chimique de la matière première:

I-1-1- Aspect :

L'hydrochloride de metformine se présente sous forme de cristaux blancs ou sensiblement blancs [02].

I-1-2- Identification :

L'identification de l'hydrochloride de metformine selon l'USP doit se faire par deux méthodes : la spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (IR) et le test des chlorures, ces deux méthodes apparaissent dans l'EP et la BP comme première identification [01, 02, 03].

I-1-2-1- La spectrophotométrie Infrarouge :

La spectrophotométrie Infrarouge (IR) est une méthode instrumentale. C'est une analyse spectrale, utilisée pour la vérification de l'identité de la matière première contrôlée [11, 20]. Dans ce cas étudié son but est donc de démontrer qu'il s'agit bien de la metformine hydrochloride. Le spectre de la substance analysée est comparé à un spectre d'absorption dans l'infrarouge d'une substance de référence (SCR), ils doivent être superposables [02, 29, 40].

La **Figure-14** montre un spectre IR de la metformine hydrochloride :

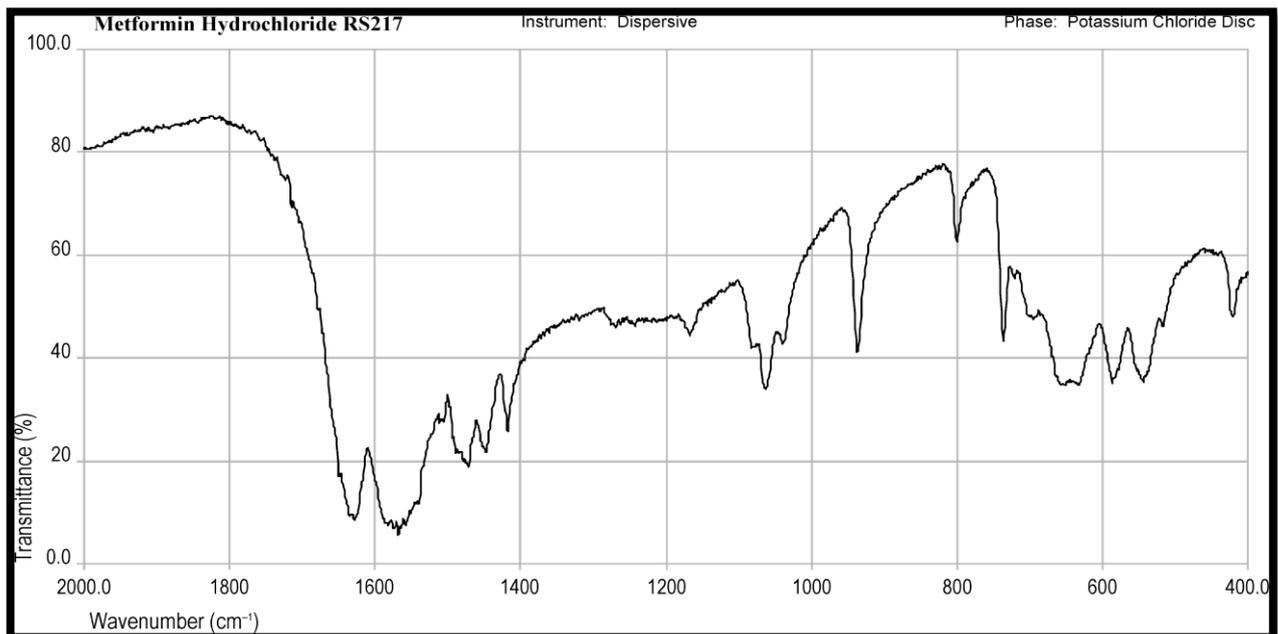


Figure 14 : Spectre infrarouge d'hydrochloride de metformine [03]

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE

I-1-2-2- Test des chlorures :

Le test des chlorures a comme objectif de confirmer la présence de la metformine sous forme de sel d'hydrochloride. Les différentes pharmacopées proposent des tests mettant en évidence la présence des ions chlorures, de sensibilité et de spécificité variable [01,02, 03, 73]. Dans la pharmacopée européenne il est décrit dans la partie "2.3.1.Réactions d'identité des ions et des groupes fonctionnels" et il se fait comme suit :

Dissolvez une quantité de la substance à examiner correspondant à 2 mg environ de chlorure (Cl⁻) dans 2 ml d'eau R, ou utilisez 2 ml de la solution prescrite. Acidifiez par l'acide nitrique dilué R. Ajoutez 0,4 ml de solution de nitrate d'argent R1. Agitez et laissez reposer. Il se forme un précipité blanc caillebotté. Centrifugez et lavez 3 fois avec 1 ml d'eau R. Effectuez cette opération rapidement, à l'abri d'une lumière vive, sans tenir compte du fait que le liquide surnageant ne devient pas parfaitement limpide. Mettez le précipité en suspension dans 2 ml d'eau R et ajoutez 1,5 ml d'ammoniaque R. Le précipité se dissout facilement à l'exception d'éventuelles particules importantes qui se dissolvent lentement.

Dans un tube à essai, introduisez une quantité de la substance à examiner correspondant à 15 mg environ de chlorure (Cl⁻) ou la quantité prescrite. Ajoutez 0,2 g de dichromate de potassium R et 1 ml d'acide sulfurique R. Placez sur l'orifice du tube à essai une bande de papier filtre imprégnée de 0,1 ml de solution de diphénylcarbazine R. Le papier se colore en rouge-violet. Le papier imprégné ne doit pas entrer en contact avec le dichromate de potassium.

I-1-3- Dosage de l'hydrochloride de metformine matière première :

Le dosage de l'hydrochloride de metformine se fait par titrimétrie en milieux non aqueux en se basant sur le fait que la substance dosée soit un sel hydrochloride d'une base organique.

Essai : 60 mg de metformine hydrochloride sont mises en solution dans 4 mL d'acide formique anhydre. On ajoute 50 mL de l'anhydride acétique puis on titre en ajoutant de l'acide perchlorique 0,1 N. Le point d'équivalence est détecté par potentiométrie. La réalisation d'un essai à blanc est nécessaire [01].

Pour 1 ml d'acide perchlorique 0.1N correspond 8.28 mg d'hydrochloride de metformine, les normes sont de 98.5% à 101.0% [01,02, 03, 29].

I-1-4- Les cendres sulfuriques dans la matière première :

Le test des cendres sulfuriques est l'essai le plus rapide et le plus général qui permet d'apprécier le taux des impuretés inorganiques présentes dans la substance active [39]. La procédure de réalisation de ce test telle qu'elle est décrite dans la pharmacopée est la suivante :

Chauffez un creuset approprié (de silice, de platine, de porcelaine ou de quartz, par exemple) à 600 ± 50 °C pendant 30 min. Laissez refroidir dans un dessiccateur sur du gel de silice ou autre desséchant approprié puis pesez.

Dans le creuset, introduisez la prise d'essai puis pesez. Humectez la substance à examiner avec un peu d'acide sulfurique R (généralement 1 ml) et chauffez doucement, à une température aussi faible que possible, jusqu'à carbonisation complète de l'échantillon. Après refroidissement, humectez le résidu avec un peu d'acide sulfurique R (généralement 1 ml). Chauffez doucement

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE

jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement de fumées blanches, puis calcinez à 600 ± 50 °C jusqu'à incinération complète du résidu.

Veillez à ce qu'il n'y ait aucune émission de flammes lors du procédé. Laissez refroidir le creuset dans un dessiccateur sur du gel de silice ou autre desséchant approprié, puis pesez à nouveau et calculez le pourcentage de résidu.

Si la quantité du résidu ainsi obtenue dépasse la limite indiquée, répétez l'addition d'acide sulfurique R, puis la calcination comme précédemment pendant des périodes de 30 min jusqu'à ce que 2 pesées ne diffèrent pas de plus de 0,5 mg ou que le pourcentage de résidu soit conforme à la limite prescrite.

La quantité de substance utilisée pour l'essai (habituellement 1-2 g) est choisie de façon à obtenir, à la limite prescrite, un résidu (habituellement de l'ordre de 1 mg) qui peut être pesé avec une exactitude suffisante.

La limite supérieure fixée par les différentes pharmacopées est de 1% déterminée dans 1g de chlorhydrate de metformine [01,02, 03].

I-1-5- Les Métaux lourds :

Les métaux lourds sont des impuretés inorganiques pouvant avoir plusieurs origines. Le matériel, les réactifs et les solvants utilisés dans les procédures de synthèse et de fabrication de la matière première peuvent être des sources de ces métaux lourds [39]. Les métaux qui vont typiquement réagir aux tests décrits dans les différentes pharmacopées sont : le plomb, mercure, bismuth, antimoine, étain, cadmium, argent, cuivre et le molybdène [02].

A partir de la 9e Edition de la PE, l'essai des métaux lourds (2.4.8.) a été supprimé dans toutes les monographies spécifiques portant sur des substances à usage humain ou vétérinaire. L'essai ne figure plus dans les nouvelles monographies. Les utilisateurs sont supposés appliquer les lignes directrices énoncées dans le *guideline* ICH Q3D [02, 29]. Tandis que cet essai figure toujours dans l'USP 40, les métaux lourds ne doivent pas dépasser 10 ppm [02].

I-1-6- Impuretés organiques :

Les substances apparentées de l'hydrochloride de metformine sont dosées par HPLC couplée UV (HPLC-UV) [01,02,03].

Deux méthodes de dosage figurent dans l'EP :

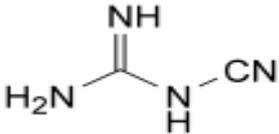
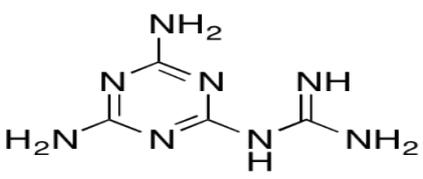
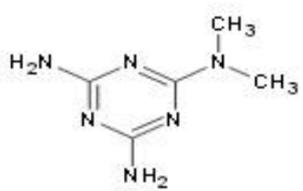
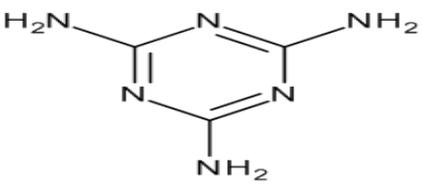
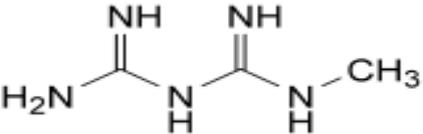
La première concerne le dosage de l'impureté spécifiée *F* ou *N-méthylméthanamine*. Elle a la particularité de n'être dosée par HPLC qu'après dérivatisation. Son dérivé est détectable à 380 nm ;

La deuxième concerne le dosage des autres impuretés (A, B, C, D et E) décelables à 218 nm. L'USP ne décrit qu'une méthode de dosage de cyanoguanidine ou substance apparentée dite A [02].

Les différentes impuretés déjà citées sont regroupées dans le tableau ci-dessous (**Tableau-5-**) :

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE

Tableau 5 : Les substances apparentées de l'hydrochloride de metformine (15).

Substance apparentée	Nom chimique	Structure chimique
A	Cyanoguanidine	
B	(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)guanidine	
C	<i>N,N</i> -diméthyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine (<i>N,N</i> -diméthylmélamine)	
D	1,3,5-triazine-2,4,6-triamine (mélamine)	
E	1-méthylbiguanide	
F	<i>N</i> -méthylméthanamine (diméthylamine)	$\text{CH}_3\text{-NH-CH}_3$

I-2- Contrôle pharmaco-technique de la metformine hydrochloride matière première : Perte à la dessiccation

C'est une méthode gravimétrique (perte de masse exprimée en pourcentage m/m), utilisée pour la détermination du taux d'humidité (le taux de l'eau et aussi les autres substances volatiles à la température de dessiccation) du produit à contrôler [02, 29].

L'PE décrit dans le chapitre des généralités dans sa partie 2.2.32 cinq (5) différentes conditions opératoires pour la réalisation de cet essai dans un dessiccateur, une étuve ou sous vide. La mise du produit dans l'étuve à 105 °C (pour harmonisation avec la JP et l'USP) se fait selon la température prescrite dans la monographie et avec une tolérance implicite de ± 2 °C préférable pour les substances stables à 105°C. La prise d'essai est choisie de telle sorte à ce que la différence des masses avant et après dessiccation soit comprise entre 5 et 50 mg [29, 52].

Dans le cas du chlorhydrate de metformine l'essai se fait dans une étuve à $105^{\circ}\text{C} \pm 2$ °C pendant cinq (5) heures, pour une prise d'essai de 1000 mg, la teneur obtenue doit être inférieure à 5% [01,02].

I-3- Contrôle microbiologique de la metformine hydrochloride matière première :

Les mesures à prendre sont faites pour éviter toute contamination accidentelle et ne doivent en aucun cas affecter les microorganismes susceptibles d'être présents dans les produits à contrôler [02].

I-3-1- Dénombrement des germes aérobies viables totaux :

On cherche à établir le nombre des bactéries mésophiles et les moisissures et levures aérobies. Ce test se fait sur MP et PF. Les modalités de réalisation des essais (nombre d'échantillons à prélever et l'interprétation des résultats) sont fixées par accord mutuel avec le fabricant et sont soumises à l'accord de l'autorité compétente [02].

- **Préparation des échantillons :**

La metformine est une matière hydrosoluble, la pharmacopée recommande en ce qui concerne les matières hydrosolubles une masse initiale de 10 grammes.

La masse pesée (10g) doit être solubilisée dans 100 ml d'une solution tampon peptonée au NaCl à pH=3 (ou un autre tampon approprié) pour avoir une dilution au 1/10 [02].

- **Examen des échantillons :**

Les aérobies viables totaux sont examinés par filtration sur membrane ou dénombrement sur plaque.

La filtration se réalise sur une membrane de nitrate de cellulose pour les solutions aqueuses (cas de la metformine) ayant une porosité nominale ne dépassant pas 0,45 μm . On utilise deux filtres et on dépose 1g du produit dans chaque filtre. On lave par 100 ml de la solution tampon peptoné à pH 7. L'un des filtres sera par la suite déposé sur une gélose B (milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja) pour rechercher les bactéries, et l'autre sur une gélose C (milieu Sabouraud-glucosé-gélosé avec des antibiotiques) pour la recherche des moisissures et de levures. L'incubation se fait pendant 5 jours à $T^{\circ} = 30$ à 35° C (gélose B) et à $T^{\circ} = 20$ à 25° C (gélose C). A la fin de l'incubation, on calcule l'unité formant colonie (UFC) par gramme de produit [02].

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE

Le dénombrement sur plaque se fait par deux techniques. L'une est un ensemencement en profondeur, l'autre est un étalement en surface. Le dénombrement sur plaque se fait dans des boîtes de Pétri de 9 cm. 1 ml de l'échantillon déjà préparé sera déposé au fond de la boîte et on fait couler la gélose liquéfiée appropriée (B ou C) à une température dépassant pas 45° C. on fait au moins deux boîtes par milieu et par dilution. On incube toutes les boîtes, 30 à 35° C pour les géloses B et 20 à 25° C pour les géloses C. Les boîtes de gélose B contenant moins de 300 colonies (100 pour les géloses C) seront sélectionnées et la moyenne arithmétique sera calculée pour déduire la valeur de l'UFC par gramme du produit. Quant à l'étalement en surface, il se fait inversement à la méthode déjà décrite et le séchage de la gélose avant d'ensemencer 0,1 ml de l'échantillon se fait sous hotte à flux laminaire ou à l'incubateur. Le nombre total des aérobies viables totaux est l'ensemble des UFC de bactéries, de moisissures et levures [02].

Pour les germes aérobies viables totaux, on tolère au maximum 10^2 bactéries et 10^3 moisissures et levures par gramme [02, 52].

I-3-2- Recherche des microorganismes spécifiés :

Ceux sont les entérobactéries et les autres bactéries gram-négatif (BGN) qui sont recherchés. Le test est aussi valable pour *Aeromonas* et *Pseudomonas* [02].

Escherichia coli est l'espèce la plus importante du genre *Escherichia*. C'est une bactérie qui métabolise les sucres par voie oxydative ou fermentaire [14].

La recherche d'*E.coli* suit les étapes suivantes :

• Préparation de l'échantillon :

C'est une étape commune avec le dénombrement des aérobies viables totaux détaillé dans la partie précédente (I-3-1). 10g sont pesés et mis en solution dans 100-ml du tampon peptoné au NaCl à pH=3.

- 10 ml seront transférés dans 100-mL du milieu liquide A (bouillon caséine-soja).
- Après homogénéisation, le flacon est incubé à 35-37° C pendant 18-24h
- 01-mL est pris après agitation et dilué dans 100-mL du milieu G (milieu liquide Mac Conkey). L'incubation se fait à 43-45° C entre 18 et 48 h.
- On effectue des subcultures sur le milieu H (milieu gélosé Mac Conkey) qui seront incubées à 35-37° C entre 18 et 72 h.

Les cultures sont positives si il y aura présence de colonies rouges, non mucoïdes, à BGN en bâtonnets, la présence de *E.coli* est possible. Si c'est le cas : les tests d'indentifications biochimiques doivent être faits par la suite [02].

Le produit est satisfait si les cultures sont négatives. *E.coli* doit être absente des produits pharmaceutiques [02, 52].

II- Contrôle in process de la Metformine Hydrochloride : Paramètres pharmaco-techniques :

II-1- Aspect des noyaux :

Il s'agit de comprimés ronds ou ovales, de couleur blanchâtre, biconvexes pour faciliter le pelliculage par la suite, sécables ou non.

II-2- Mesure des dimensions du comprimé nu :

On mesure le diamètre et l'épaisseur du noyau à l'aide d'un pied à coulisse. Les spécifications sont décrites dans les procédures internes propres à chaque producteur.

II-3- Test d'uniformité de masse :

L'uniformité du dosage unitaire est un paramètre important ayant comme but le contrôle de la répartition dans les préparations présentées en unités de prise [52]. Pour démontrer l'homogénéité de la répartition du mélange initial en unité de prise l'USP cite deux méthodes: l'uniformité de teneur et l'uniformité de masse. En règle générale, les comprimés non enrobés et les comprimés pelliculés dont la quantité de la substance active est supérieure à 25 mg, la méthode à utiliser est l'uniformité de masse [01]. Ce cas s'applique aux comprimés nus et les comprimés pelliculés ayant comme substance active l'hydrochloride de metformine.

Cet essai n'est exigé que pour les comprimés non enrobés et, sauf exception autorisée, pour les comprimés pelliculés [01]. L'uniformité de masse est conditionnée par la fluidité des granulés obtenus au cours de la fabrication [52].

Le machiniste chargé de la compression effectue des pesées à des intervalles de temps fixes. Cette tâche consiste à peser 20 comprimés en vrac nu à l'aide d'une balance, la masse individuelle de 2 au maximum des 20 unités peut s'écarter de la masse moyenne d'un pourcentage de 5%, mais la masse d'aucune unité ne peut s'écarter de plus du double de ce pourcentage donc de plus de 10% [02].

II-4- Test de Friabilité :

La friabilité est le phénomène par lequel la surface des comprimés est endommagée ou par lequel des signes d'abrasion ou de rupture apparaissent, sous l'effet de chocs mécanique (chutes) ou d'une attrition (frottements). Ce paramètre est exprimé en pourcentage de perte par rapport à la masse initiale. Le test de friabilité permet de prouver la capacité du comprimé à résister à toute les manipulations qu'il aura à subir jusqu'au moment d'utilisation. Ce test est harmonisé entre l'EP, l'USP et la pharmacopée japonaise [01, 04, 52].

Le test de friabilité est réalisé à l'aide d'un friabilimètre (tambour rotatif normalisé). A chaque rotation les comprimés sont projetés du centre du tambour vers la paroi extérieure selon une trajectoire curviligne avec une vitesse de rotation de 25 tours/min. Les comprimés sont pesés avant et après ce traitement. La perte de masse doit être minime [02].

Dix comprimés nus de la metformine préalablement pesés sont placés dans le friabilimètre. Après une rotation à 100 rotations pendant 4 min ces comprimés seront de nouveau pesés. Les différentes pharmacopées exigent un taux de friabilité inférieur ou égal à 1%.

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE

II-5- Résistance à la rupture des comprimés :

Ou test de dureté, est un essai qui consiste en la mesure de la force mécanique nécessaire pour provoquer la rupture des noyaux par écrasement. Les normes sont fixes pour chaque producteur [02].

II-6- Test de désagrégation :

La désagrégation ou "délitement" n'implique pas une dissolution complète [02]. Elle vise à solubiliser le noyau dans l'eau. Ce test se fait sur six (6) comprimés prélevés sur chaque lot fabriqué. Différents types d'appareil existent, celui que décrit la pharmacopée est constitué de six tubes dont chacun reçoit un comprimé. Le dispositif est plongé dans de l'eau à $37 \pm 1^\circ \text{C}$. Un bon comprimé doit se dissoudre en moins ou égal à 30 minutes.

III- Contrôle de la Metformine Hydrochloride Produit Fini :

III-1- Control physico-chimique de la metformine hydrochloride produit fini :

III-1-1- Aspect du produit fini :

Comprimés enrobés, pelliculés sécables ou non (selon le dosage).

III-1-2- Identification du produit fini :

L'identification de la metformine hydrochloride dans le produit fini peut se faire soit par spectrométrie IR (*Figure -15-*) ou par réaction colorée.

La vérification de la présence de la metformine sous sa forme de sel d'hydrochloride se fait par la réaction des chlorures.

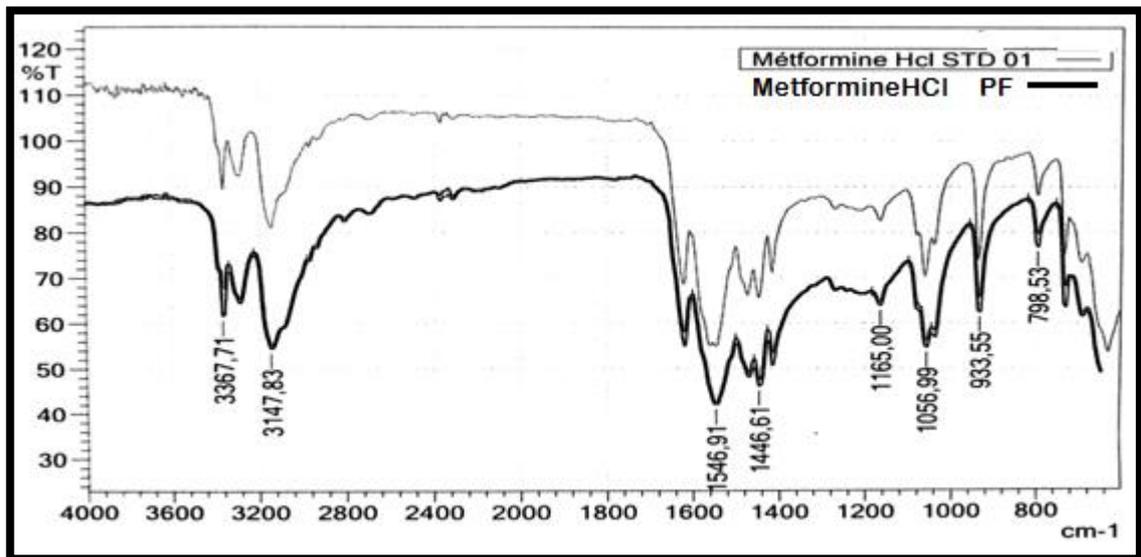


Figure 15 : Spectre infrarouge d'un PF de metformine hydrochloride [03].

III-1-3- Dosage du chlorhydrate de metformine produit fini :

Le dosage du chlorhydrate de metformine peut se faire par plusieurs méthodes, celle décrite par l'USP et la BP est une méthode de dosage par spectroscopie d'absorption dans l'UV. Le chlorhydrate de metformine a un maximum d'absorption à 232 nm quand le solvant est l'eau purifiée (La procédure sera détaillée dans la partie pratique Chapitre III).

La concentration des solutions standards et d'essais en chlorhydrate de metformine, est de l'ordre de 0.1 mg/mL [01,03].

III-1-4- Le dosage des impuretés dans le produit fini :

L'USP exige le dosage de l'impureté D (mélamine), tandis que la BP impose le dosage de l'impureté A (cyanoguanidine) [01, 03]. Le dosage de ces impuretés se fait par HPLC-UV dont les conditions de réalisation sont décrites comme suit :

- **Le dosage de la mélamine selon l'USP : [01]**

Mode : Chromatographie liquide

Phase mobile : 17 g/L du dihydrogenophosphate d'ammonium dans l'eau ajusté avec l'acide phosphorique à un PH=3.07.

Phase stationnaire : L9 : Gel de silice totalement poreuse avec des pores sphériques ou irréguliers, ayant un groupement chimique fortement acide à membrane échangeuse de cations. Son diamètre est de 3 à 10- μ m.

Dimensions de la colonne : 4.6-mm x 250-mm

Débit : 1.0-1.07 mL/min

Temps d'analyse : Deux fois le temps de rétention du chlorhydrate de metformine.

Volume d'injection : 20 μ L

Détection : UV à 218

- **Le dosage de la cyanoguanidine selon la BP : [03]**

Mode : Chromatographie liquide

Phase mobile : 17 g/L du dihydrogenophosphate d'ammonium dans l'eau ajusté avec l'acide phosphorique à un PH=3.07.

Phase stationnaire : Gel de silice greffé par un groupement de l'acide benzène sulfonique avec une porosité de 5- μ m.

Dimensions de la colonne : 4.6-mm x 125-mm

Débit : 1.0 mL/min

Temps d'analyse : Deux fois le temps de rétention du chlorhydrate de metformine.

Volume d'injection : 20 μ L

Détection : UV à 218

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE

III-2- Contrôle Pharmaco-technique du produit fini :

III-2-1- Test de dissolution :

Le test de dissolution est utilisé pour déterminer la vitesse de dissolution du principe actif contenu dans les formes solides tels que les comprimés..

La pharmacopée décrit quatre méthodes pour la détermination de la vitesse de dissolution en fonction du dissolu-test utilisé : Appareil à palette tournante, appareil a panier tournant, méthode à cellule à flux continu et appareil à piston [02].

Le test de dissolution doit se faire dans des conditions prédéfinies : composition, volume et température du milieu de dissolution, la vitesse d'agitation de la palette, du panier ou le débit pour la cellule à flux continue, le nombre d'essais et le temps de réalisation de la méthode. Le principe actif est dosé à l'aide d'une méthode analytique appropriée. Le tableau suivant (**Tableau-6-**) résume les conditions opératoires exigé par l'USP pour la réalisation du test de dissolution des comprimés enrobés de l'hydrochloride de metformine. L'USP décrit 3 tests de dosage de l'hydrochloride de metformine après dissolution. Les deux premiers tests se font par spectroscopie UV, tandis que le troisième est un dosage par HPLC [01].

Le test (01) consiste à doser directement l'hydrochloride de metformine dissout dans le dihydrogenophosphate de potassium après une simple filtration de la solution obtenue. La concentration de cette substance active ne doit pas être inférieure à 70% de la concentration initiale du comprimé. Le maximum d'absorption est à 233 nm [01].

Les conditions opératoires du test sont décrites dans le tableau ci-après (**Tableau-6-**) :

Tableau 6 : Les conditions opératoires du test de dissolution (01) exigées par l'USP (2).

Composition du milieu de dissolution	Dihydrogenophosphate de potassium
PH du milieu de dissolution	6,8
Volume du milieu de dissolution	1000 ml
Température	37° +/- 0,5
La vitesse d'agitation de l'appareil à palette tournante	100 tours/min
temps d'agitation	45 min
Nombre d'essai	comprimés

CHAPITRE III : LE CONTROLE-QUALITE DE LA METFORMINE

III-2-2- Test de sécabilité :

Les comprimés sécables font partis des formes unitaires fractionnables, ils comportent une rainure ou deux rainures en croix. Pour assurer que le malade aura bien la dose prévue après fractionnement du comprimé, il faut vérifier que les fractions sont de masse à peu près égale et cela par la réalisation de test de sécabilité [52].

Ce test est réalisé sur les comprimés comportant un ou deux barres de cassure. Le comprimé d'hydrochloride de metformine du dosage 1000 sont des comprimés sécables.

III-3- Contrôle microbiologique des produits finis:

Pour les produits finis, les germes recherchés sont les mêmes que ceux recherchés dans la matière première (titre : **I-3**). On prend cinq (5) échantillons de chaque lot (pour avoir les 10 grammes on peut prendre 2 grammes de chaque échantillon), puis on procède comme pour le contrôle microbiologique de la matière première [02].

PARTIE PRATIQUE

INTRODUCTION DE LA PARTIE PRATIQUE :

Dans le présent travail deux méthodes pharmacopées d'analyse du chlorhydrate de metformine seront comparées : La spectroscopie-UV et l'HPLC.

L'objectif de cette étude expérimentale comparative est de mettre en évidence les points de convergences et de divergences entre les deux méthodes analytiques, et de voir la place et l'intérêt de chacune des deux méthodes dans l'analyse de la metformine hydrochloride.

Pour évaluer une méthode analytique, on doit tester si son principe est valable pour parvenir à un but déjà fixé, si ses valeurs techniques et économiques lui confèrent une souplesse d'utilisation et un coût raisonnable par analyse, et si sa valeur analytique et sa précision sont satisfaisantes. Une méthode précise est une méthode fidèle : avec une bonne reproductibilité et une bonne répétabilité, juste : où les résultats obtenus par cette méthode sont en complète accord avec une méthode de référence et sensible aux variations des concentrations détectées [115, 116].

Deux stages industriels d'un mois (1) et de trois (3) mois ont été effectués dans le cadre du suivi de deux produits : il s'agit du princeps GLUCOPHAGE® de MERCK, produit au niveau de l'industrie pharmaceutique NOVAPHARM de Bousmail, et du générique DIAGUANID® fabriqué par l'industrie SAIDAL unité PHARMAL site de Dar El Beida. Une semaine au Centre de Recherche en Analyses Physico-Chimiques CRAP-C de Bousmail a clôturé l'étude pratique.

Tout au long des stages, trois (3) dosages ont été analysés : 500, 850 et 1000 mg. La spectroscopie-UV de plusieurs lots de chaque dosage a été réalisée dans les deux industries, complétée par le balayage des MP, de deux (2) lots pour les dosages 500 et 850 et d'un lot du dosage 1000 répété trois (3) fois.

L'HPLC-UV, quant à elle, a été faite dans l'unité PHARMAL de SAIDAL et aussi au niveau du CRAP-C pour avoir plus de résultats pour les différents dosages étudiés.

Le total des échantillons analysés par spectroscopie-UV est de 29 lots, la courbe d'étalonnage a été tracée après la réalisation d'une série de dilution. Pour l'HPLC six (6) lots ont été sélectionnés dans l'ensemble des trois dosages, en plus d'un standard externe.

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) ont été respectées lors de la présence et la manipulation des échantillons dans les différents laboratoires. Toutes les mesures de sécurité ont été prises en vue de minimiser tout risque probable : le port des blouses, des gants et des masques surtout lors de la réalisation de l'analyse chromatographique en utilisant différents solvants organiques.

La collection des résultats et leur traitement, ainsi que les représentations graphiques ont été faits à l'aide de Microsoft Excel.

Chapitre II : Matériel et Méthodes :

I- Matériel :

Les équipements utilisés lors de la réalisation des dosages spectroscopique et chromatographique de la metformine hydrochloride sont qualifiés, calibrés et étiquetés correctement avec leurs références. La verrerie était de la qualité requise pour chaque analyse, ainsi que les consommables qui étaient stériles et à usage unique. Les réactifs de la chromatographie sont tous de grade HPLC.

I-1- Appareillage :

I-1-1- Spectromètre UV :

Deux spectrophotomètres UV-Vis ont servi au dosage des PF :

- *Shimadzu*, model *UV-1800* spectrophotomètre UV-Visible.
Date limite de validation : 20/11/2018 + 30 jours.
Piloté par le logiciel *LabSolutions* : *UV-Probe* version 2.43.
 - Cuve : *Quartz Cuvette*, Model 10-mm.

- *PerkinEimer* instruments, model *Lymbda-25* spectrophotomètre UV-Visible.
Dernière confirmation : 25/09/2017.
Prochaine confirmation : 25/09/2018.
Lié au logiciel : *PerkinEimer UV WinLab Data Processor and Viewer*, version 1.00.00.
 - **Cuve** : *PerkinEimer* instruments, *Quartz cell* N°B0631107.

I-1-2- Appareil HPLC :

Deux (02) HPLC couplés à un détecteur UV ont été utilisés :

- *WATERS E2695* couplé à un détecteur UV : *WATERS E2489*. Doté d'un Injecteur automatique. Les 4 sorties sont liées aux différents solvants.
Piloté par le logiciel d'acquisition, de traitement et de gestion des données chromatographiques : *EmpowerTM 3 WATERS*.
 - **Colonne** : *WATERS C18 L1*, 4,6-mm x 250-mm, 5µm.

- *YL 9100 HPLC SYSTEM*, fait de :
 - YL 9100 Vacuum Degasser.*
 - YL 9110 Quaternary Pump.*
 - YL 9131 Column Compartment.*
 - YL 9120 UV/Vis Detecteur.*Lié au logiciel *YL-Clarity*
 - **Une boucle d'injection manuelle** de 20 µL,
 - **Une seringue chromatographique**, *SGETM 50 µL*.
 - **Colonne** : *RESTEK Pinnacle II C18* : 4,6-mm x 150-mm, 5µm.

I-1-3- Balances analytiques :

- De marque *OHAUS*, model *Pioneer*, et son imprimante.
Date de qualification : 30/01/2018.
Date de requalification : 29/07/2018.
Calibration assistée : le 18/03/2018 par les poids 20, 100 et 200 mg.
- De marque *RADWAG* model *AS.220.R2*.
- De marque *SARTORIUS Analytical balance*, model *Extend*, et son imprimante.
Dernière qualification : 13/05/2018.
Prochaine qualification : 12/08/2018.
Calibration assistée le : 12/04/2018.

I-1-4- Bain à Ultrasons :

- De marque *ELMASONIC*, model *S-80-H*.

I-1-5- pH-mètre :

Les pH-mètres utilisés sont de marques :

- *INOLAB*, model *US-151*.
Date de qualification : 01-03-2018.
Date de requalification : 28-02-2019.
- *HANNA* instruments.

I-1-6- Appareils à filtration sous vide en verre :

I-1-7- Appareil de purification de l'eau distillée :

- *Ultra 370 Series*, model : *Aqua MAX*, Water Purification System.

I-2- Verreries :

I-2-1- Verrerie de non précision : stérilisable à la chaleur :

I-2-1-1- Bêchers :

- 100-mL
- 50-mL
- 10-mL.

I-2-1-2- Entonnoir en plastique à tige courte

I-2-1-3- Mortiers et pilon

I-2-2- Verrerie de précision :

I-2-2-1- Epruvettes graduées :

Les épruvettes utilisées sont :

- 1000-mL *Reviera* classe B en verre.
- 500-mL et 1000-mL *MBL IN 20°C* en verre borosilicaté classe A.

I-2-2-2- Fioles jaugées :

Les fioles jaugées utilisées lors des dosages étaient de :

- 1000-mL (*SHOTT DURAN borosilicate classe A*)
- 100-mL (EM classe A), 100-mL (*ISOLAB borosilicate classe A*)
- 50 mL (*ISOLAB*)
- 25 mL (*DURAN classe A, In 20 °C*)
- 10 mL (*SHOTT DURAN classe A*)

I-2-2-3- Pipettes (graduées et jaugées) et pipettes automatiques :

- Pipettes automatiques de 100-1000 μ L et 1000-5000 μ L (*ISOLAB*).
- Les pipettes en verre utilisées sont de différents volumes :
 - 0,5 mL, 1 mL (*MBL verre sodocalcique AS*).
 - 10 mL (*DURAN verre sodocalcique AS*).

On a également utilisé :

- Pipeteur (pompe à crémaillère)
- propipette en caoutchouc.

I-3- Consommables :

I-3-1- Les Filtres :

I-3-1-1- Les Filtres à membrane :

- 0.45 μ m

I-3-1-2- Filtres à seringue :

- *Millipore Millex-HV Hydrophilic PVDF, 0,45- μ m.*

I-3-2- Seringues :

- 5 mL, *PRONO CI crête*, exp 06/2022.
- 5 mL, *IMC, UL TRAL ISS 098/16*, exp 03/2022.

I-3-3- Vials :

- De 2 mL de marque *WATERS* et *ISOLAB*.

I-4- Autres :

- Pissettes pour eau distillée et purifiée
- Pots stériles pour conservation des échantillons :
 - FL Italy, fabriqués 11/17 à 11/22. CE
 - LOT: 17C3189, in Cleanroom iso 8
- Spatules
- Sabots pour peser

II- Réactifs :

La réalisation correcte des procédés analytiques ainsi que la fiabilité des résultats obtenus dépendent en partie de la qualité des réactifs employés. Pour satisfaire le but de chaque analyse on a veillé à ce que les réactifs utilisés répondent aux exigences des monographies en question.

II-1- Acétonitrile :

- de marque *PanReac® AppliChem* fait par *ITW Reagents*. [174]
N° de lot : 0001.2079.29.
Date de Retest : 08-2021.
- *Honeywell*. [170]
N° de lot : H2060,
Date d'expiration : 15-07-2019.

Leurs certificats d'analyse (COA) se trouvent en Annexe [VI] et [VII] successivement. La **Figure-16-** donne des informations concernant l'usage de l'Acétonitrile :

 Xn - Nocif	R 11	Facilement inflammable.
	R 20/21/22	Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.
 F - Facilement inflammable	R 36	Irritant pour les yeux.
	S 1/2	Conserver sous clé et hors de portée des enfants.
	S 16	Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer.
	S 36/37	Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

Figure 16 : Informations relatives à l'emploi de l'ACN [15].

II-2- Acide phosphorique :

Deux acides orthophosphoriques ont été utilisés :

- *Sigma-Aldrich* [178], N° de lot : SZBB1170V.
- *VWR AnalaR NORMAPUR* [184], N° de lot : 13D190511.

Leurs certificats d'analyse se trouvent en Annexe [IX] et [X] successivement.

C'est un produit dangereux [69]. La **Figure-17-** résume quelques informations nécessaires à connaître lors de la manipulation de l'acide orthophosphorique.

 C - Corrosif	R 34	Provoque des brûlures.
	S 1/2	Conserver sous clé et hors de portée des enfants.
	S 26	En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
	S 45	En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin; si possible lui montrer l'étiquette.

Figure 17 : Informations relatives à l'emploi de l'acide phosphorique [15].

II-3- Chlorures de sodium (NaCl) :

- Le premier est de marque *VWR Prolabo-Chemicals, AnalaR NORMAPUR*, [184]
N° de lot : 13G090003.
Date de péremption : 07-2018

Le COA du produit se trouve Annexe [VIII]

- Le deuxième est de marque *ChemLab*,
N° de lot : LRS00005
Date de péremption : 05-2018.

II-4- Eau purifiée :

- **Bulletin de contrôle microbiologique :**
Germes Aérobie Totaux : UFC/mL < 100
Pseudomonas aerogenosa : Négatif
- **Bulletin de contrôle physicochimique :**
Aspect conforme : incolore, inodore, insipide
Conductivité à 20 °C : < 4,3 µS/mL
pH : entre 5 et 7
Substances oxydables : conformes
Nitrates : < 0,2 ppm
Métaux lourds : < 0,1 ppm

II-5- Le 1-Heptane sulfonate de sodium :

De marque Sigma-Aldrich [178], N° de LOT : BCBP7095V.
Son COA se trouve en Annexe [XI]

III- Méthodes :

III-1- Méthode 01 : Spectroscopie UV

Différentes méthodes de quantification du chlorhydrate de metformine dans l'UV sont décrites dans la littérature², dont celles de l'USP et BP. La pharmacopée japonaise (PJ) par contre, cite la méthode dans l'identification de la MP par la réalisation d'un balayage de cette MP et du SCR et la comparaison de leurs spectre d'absorption [01,03,04].

La méthode spectroscopique UV que nous avons réalisée est la méthode de l'USP décrite dans le dosage des PF. Elle se trouve en Annexe dans la monographie metformine PF USP 40 [Annexe II].

III-1-1- Conditions opératoires de la méthode 01 :

- Température : 25 °C
- Longueur d'onde de détection : 232 nm
- Blanc : eau distillée

III-1-2- Protocole de la méthode spectroscopique UV :

Pour la réalisation d'une analyse du chlorhydrate de metformine dans un produit fini (comprimé), on passe par plusieurs étapes de préparation. Dans cette méthode, on prépare une solution STD, et une solution d'essai pour chaque échantillon. La concentration finale des solutions standards et d'essais préparées est de l'ordre de 10 µg/mL.

a- Préparation de la solution standard :

Comme première étape, on pèse 100 mg ± 5 mg du STD à l'aide d'une balance analytique préalablement calibrée. Ensuite, dans une fiole jaugée à 100-mL, on rajoute à la quantité de la poudre pesée de l'eau distillée sans atteindre le trait de jauge. On met la fiole dans un bain à Ultrason pendant cinq (5) min à T= 25 °C. Après refroidissement de la solution on ajuste au volume puis on homogénéise manuellement durant 10 minutes. A la fin, on fait une dilution au 1/100^{ème} en rajoutant à 1 mL de la solution de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge d'une autre fiole de 100-mL.

b- Préparation de la solution d'essai :

Vingt (20) comprimés de chaque lot ont été pesés et leur masse moyenne (MM) a été déterminée. Un broyage à l'aide d'un mortier est nécessaire pour obtenir une poudre fine. On pèse l'équivalent de 100 mg de chlorhydrate de metformine calculé par la formule :

$$m = \frac{MM}{\text{Dosage}} 100$$

De ce fait :

Pour les PF 500 mg : L'équivalent de 500 mg de metformine hydrochloride a été pesé, à l'aide de l'équation :

$$m = \frac{MM}{500} 100$$

² Nombreuses méthodes spectroscopiques-UV de contoles de metfomine HCl existent : [92, 93, 119,133, 135, 144,151, 152, 175, 177]. *

Pour les PF 850 mg : L'équivalent de 850 mg de metformine hydrochloride a été pesé, à l'aide de l'équation :

$$m' = \frac{MM}{850} 100$$

Pour les PF 1000 mg : L'équivalent de 1000 mg de metformine hydrochloride a été pesé, à l'aide de l'équation :

$$m'' = \frac{MM}{1000} 100$$

On met la quantité pesée dans une fiole jaugée de 100-mL et on rajoute une quantité d'eau distillée sans atteindre le trait de jauge. On met alors la préparation au bain à Ultrasons pendant cinq (5) minutes T=25 °C. A la sortie du bain à Ultrasons on homogénéise manuellement pendant 10 minutes. On laisse refroidir et on ajuste avec le même solvant (l'eau distillée).

La solution est filtrée à l'aide d'une seringue de 5-mL à laquelle on a placé un filtre à seringue de 0.45 µm. On jette les deux premiers tiers et on met la partie restante dans un bécher. On prend du filtrat 1-mL à l'aide d'une pipette jaugée, on le met dans une autre fiole de 100-mL et on complète avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

III-1-3- Lecture :

La lecture se fait dans une cellule en quartz qui a la propriété de ne pas absorber dans l'UV. La longueur d'onde est fixée à 232 nm, étant le maximum d'absorption de la metformine hydrochloride. On commence par éliminer l'absorbance du solvant. Le blanc utilisé est de l'eau (distillée ou purifiée selon ce que nous avons utilisé dans la préparation des solutions STD et essais).

Le STD est lu trois (03) fois pour déterminer son absorbance moyenne, et chaque solution d'essai est lue quatre (04) fois, leurs absorbances moyennes sont calculées par la suite.

Un balayage d'une bande allant de 205 ou 210 jusqu'à 240 ou 260 nm a été réalisé sur une solution de deux (02) MP et de deux (02) PF des dosages 500 et 850 mg, et d'un PF de 1000 mg fait en deux fois le même jour, et une troisième fois à un intervalle d'un mois, dans le but de d'étudier l'aspect qualitatif de la spectroscopie UV.

III-2- Méthode 02 : HPLC :

Il existe de nombreuses méthodes chromatographiques proposées pour le dosage de la metformine hydrochloride dont des méthodes à échange d'ions, RP-HPLC³.

La méthode chromatographique réalisée dans cette étude pour doser la metformine hydrochloride dans les PF est la méthode pharmacopée RP-HPLC figurant dans l'USP sous le titre '*Glyburide and Metformin Hydrochloride Tablets*'. [Annexe III]

³ La littérature cite tant de méthodes chromatographique de dosage du chlorhydrate de metformine : [94, 101, 112, 113,124,128, 135, 137, 138, 147, 148, 151, 152, 156, 157].

C'est une méthode utilisant un régime isocratique, avec un bas pH = 3.85 s'opposant à la basicité de la molécule [113].

La colonne utilisée dans l'HPLC 01 est une C18, L1 (octadecilsilane) [100], aux dimensions 250-mm x 4,6-mm 5µm [Annexe XII] ; et celle de l'HPLC 02 est une C18, L1 aux dimensions 150-mm x 4,6µm 5µm (ses dimensions répondent aux ajustements permis par l'USP : Annexe [V]). Le phénomène entrant en jeu est l'appariement d'ions en utilisant un agent d'appariement qui est dans ce cas l'heptanesulfonate de sodium, une molécule hydrophobe avec un $\log P_{\text{octanol : eau}} = 0,565$ qui sert à augmenter le t_R qui était très court en simple RP [09,41, 59, 39, 12, 113].

Cette méthode sert à déterminer la concentration de la metformine seule dans cette association. On la rencontre aussi dans la partie '*Metformin Hydrochloride Extended-Release Tablets*' avec une légère différence dans les étapes de préparation de l'échantillon [Annexe IV].

III-2-1- Conditions opératoires de la méthode 02 :

- Mode d'élution : isocratique.
- PM : mélange de tampon fait de l'heptane sulfonate de sodium et NaCl et de l'Acétonitrile (10:90) au pH = 3,85 et de l'Acétonitrile 1:40.
- Colonne : C18 250-mm x 4,6-mm 5µm, L1 et C18 150-mm x 4,6-mm 5µm
- Débit d'élution : 1 mL/min.
- Longueur d'onde de détection UV : 218 nm.
- Température de la colonne : 30 °C.
- Volume d'injection : 10 µL.

III-2-2- Le protocole de la méthode HPLC :

Le dosage est réalisé sur deux (02) PF de 1000 mg, de 850 mg et 500 mg. Le standard utilisé est un étalon externe : il s'agit d'une MP dont la pureté est de 100,29. Pour réaliser ce dosage on a besoin de préparer 3 solutions : une solution tampon A, la PM et le diluant, en plus de la solution standard et d'essais. Le dosage des impuretés B et C est aussi possible par cette méthode, mais nous ne l'avons pas fait.

a- Préparation de la solution A :

La première solution à préparer est la solution A ou solution tampon.

L'équivalent de **0.5 gramme** du 1-heptanesulfonate de sodium ($C_7H_{15}NaO_3S$) est pesé à partir de son sel monohydraté. On doit peser :

$$m' = M' \frac{m}{M}$$

Avec :

m' : masse équivalente à peser de l'heptanesulfonate de sodium monohydraté.

M' : masse molaire de l'heptanesulfonate de sodium monohydraté, égale à 220,26 g/mol.

m : masse requise pour la préparation, égale à 0.5 g.

M : masse molaire de l'heptanesulfonate de sodium, égale à 202.24 g/mol.

La masse équivalente à 0.5 g de heptanesulfonate de sodium est : $m' = 0,544$ g du heptanesulfonate de sodium monohydrate

La masse pesée est ensuite mise en présence de **0,5 gramme** du chlorure de sodium (NaCl) dans une fiole de 1000-mL. On rajoute 850-mL d'eau et on homogénéise. Le pH de cette solution est près de 6 on doit l'ajuster à l'aide de l'acide orthophosphorique dilué à 0,06 M jusqu'à la valeur **pH = 3,85** et on continue avec de l'eau jusqu'au trait de jauge de 1000-mL.

Les pH-mètres sont utilisés dans notre étude pour ajuster le pH de la phase mobile. Avant l'emploi de ces derniers, ils ont été calibrés sur 3 valeurs de pH : la sonde lavée par le KOH au préalable est plongée dans des solutions étalons à pH=4, pH=7 et pH=10.

VN : [96-105 %]

Au moment de l'ajustement dans l'éprouvette graduée de 1 L la sonde est plongée dans la solution et la valeur du pH est suivie jusqu'à affichage de la valeur voulue.

b- Préparation de la phase mobile :

La phase mobile est faite du mélange de l'Acétonitrile et de la solution A à raison de 10:90. A 100-mL d'Acétonitrile on rajoute 900-mL de la solution A et on homogénéise. Le volume final de la phase mobile est de 1000-mL et il est largement suffisant dans le dosage réalisé.

La filtration de la PM se fait extemporanément en utilisant un appareil à filtration sous vide en verre muni d'un filtre à membrane compatible avec l'Acétonitrile 0.45- μ m. Le dégazage se fait au même temps que la filtration.

c- Préparation du diluant des échantillons :

Ce diluant est de l'Acétonitrile à 2,5 % équivalent au mélange Acétonitrile : Eau (1:40). 12,5-mL d'Acétonitrile sont rajoutés à 500-mL d'eau purifiée.

d- Préparation de la solution standard :

25 mg de la Metformine hydrochloride étalon externe sont mis en solution dans 100-mL du diluant. La metformine hydrochloride n'est pas bien soluble dans le diluant de ce fait la fiole est introduite dans le bain à Ultrasons jusqu'à solubilisation complète à T=25° pour accélérer sa dissolution. La concentration de la solution standard est égale à **0,25 mg/mL**.

e- Préparation de la solution essai :

La concentration des solutions essais est égale à **0,25 mg/mL**.

L'équivalent de 500, 850 et 1000 mg des PF 500,850 et 1000, correspondants aux masses moyennes respectives ont été pesés.

La quantité pesée de chaque PF a été mise dans une fiole jaugée de 20-mL, à laquelle on a rajouté le diluant sans atteindre le trait de jauge, ensuite, une homogénéisation à l'aide d'un bain à Ultrasons a été réalisée jusqu'à solubilisation complète à 25°C.

Les solutions mères ont des concentrations :

$$C_i = \frac{m_i}{20} \text{ mg/mL}$$

Ou : m_i est la masse déjà pesée.

Afin d'arriver à une concentration de **0.25 mg** de chlorhydrate de metformine dans chaque solution fille, on a prélevé de chaque solution mère un volume v préalablement calculé selon l'équation suivante :

$$V = 25 \frac{1}{C_i}$$

Pour les PF 1000 : V=0,5-mL
Pour les PF 850 : V=0,588-mL
Pour les PF 500 : V=1-mL

Les volumes prélevés ont été mis dans des fioles jaugées de 100-mL, et on complète au volume à l'aide de l'eau purifiée, pour avoir une concentration finale de **0.25 mg/mL** de metformine hydrochloride.

III-2-3- L'analyse HPLC et le traitement des résultats :

Pour chaque analyse HPLC, le système chromatographique doit être réglé selon les conditions opératoires déjà fixée par la méthode. Un rinçage de la colonne est nécessaire pour éliminer les éventuels résidus de l'analyse précédente [64]. Le rinçage est fait à l'aide de l'eau puis de l'Acétonitrile puis de l'eau une deuxième fois. La température de la colonne est fixée à 30°C.

Le débit exigé de 1-mL/min est ensuite atteint progressivement afin d'éviter des pressions trop élevées qui risque de faire éclater la colonne. Le système chromatographique est stabilisé en faisant passer la PM à travers la colonne jusqu'à obtention d'une ligne de base stable sur le chromatogramme.

Lors de l'utilisation d'un appareil HPLC muni d'un auto-échantillonneur à auto-injecteur, les solutions déjà préparées sont mises dans des vials, ces vials sont ensuite mises dans des carrousels. Dans le cas de l'injection manuelle : 50-µL de chaque solution est prélevé et directement injectés dans la boucle de 20-µL à chaque séparation.

Le temps de rétention de la metformine hydrochloride n'a pas dépassé les dix (10) minutes dans les deux HPLC lancés. Un processus de traitement des signaux collectés est ensuite converti en pics apparaissant sur le chromatogramme, qui permet d'avoir les paramètres caractérisant un pic.

Chapitre III : Résultats et discussions :

La fourchette choisie pour la représentation des concentrations n'est que l'intervalle des valeurs normales pour chaque dosage, et qui est égal à $\pm 05\%$ de la concentration théorique du dosage. Les produits analysés des trois dosages ont été désignés par une numérotation continue de manière ascendante (de 01 à 29), ainsi on a :

Les PF 500 mg : de 01 à 08

Les PF 850 mg : de 09 à 14

Les PF 1000 mg : de 15 à 29

Pour faciliter la lecture des représentations graphiques, nous avons attribué à chaque dosage une couleur qui lui est propre dans chaque méthode :

Les PF 500 mg : Bleu ciel

Les PF 850 mg : vert

Les PF 1000 mg : Bleu foncé

I- Résultats et discussion de la spectroscopie UV :

I-1- Analyse quantitative par spectroscopie UV :

Avant chaque analyse quantitative par n'importe quelle méthode, il est primordial de vérifier la linéarité de la méthode par la réalisation d'une gamme d'étalonnage par un STD à différentes concentrations connues. La déduction des concentrations des échantillons se fera par la suite par interpolation.

I-1-1- La courbe d'étalonnage de la spectroscopie UV :

En vue de vérifier la linéarité et la sensibilité de la méthode, une série de dilution a été effectuée. A partir d'une solution préparée du STD à 1 mg/mL plusieurs dilutions sont faites : une première dilution au un demi (1/2) suivie de cinq (05) dilutions au un dixième (1/10) jusqu'à la concentration 5.10^{-6} mg/mL. Ces dilutions sont ensuite lues au spectrophotomètre UV-vis.

Une première lecture a montré que les solutions de 1 mg/mL, 0.5 mg/mL et 0.05 mg/mL ont des absorbances égales ou supérieures à 3.

Cette lecture a permis d'éliminer les absorbances des deux (02) premières solutions. Les résultats obtenus sont dans la **Figure -18-** :

Wavelength program - Lambda 25 morcrodl 23 mai 2018 11:20 Temps universel coordo

Data Table

Sample ID	Description	232.0
E3	0,05 mg/ml	3.0040
E4.1	5 µg/ml	0.4413
E4.2	∕	0.4402
E4.3	∕	0.4293
E4.4	∕	0.4287
E5.1	$5 \cdot 10^{-4}$ mg/ml	0.0398
E5.2	∕	0.0400
E5.3	∕	0.0457
E5.4	∕	0.0436
E6.1	$5 \cdot 10^{-5}$ mg/ml	0.0107
E6.2	∕	0.0108
E6.3	∕	0.0142
E6.4	∕	0.0142
E7.1	$5 \cdot 10^{-6}$ mg/ml (ng)	0.0283
E7.2	∕	0.0277
E7.3	∕	0.0104
E7.4	∕	0.0118



Printed by:
 Template:
 Print Date and Time:

Administrator
 Default-Wavelength Program
 mai 23, 2018 12:18:58 Temps universel coordonné

Page 1 of 2

Figure 18 : Résultats de lecture spectroscopique de la série de dilution.

A partir des absorbances moyennes obtenus des concentrations connues du STD, la courbe d'étalonnage a été tracée par Excel (*Figure -19-*) pour toutes les valeurs et on a :

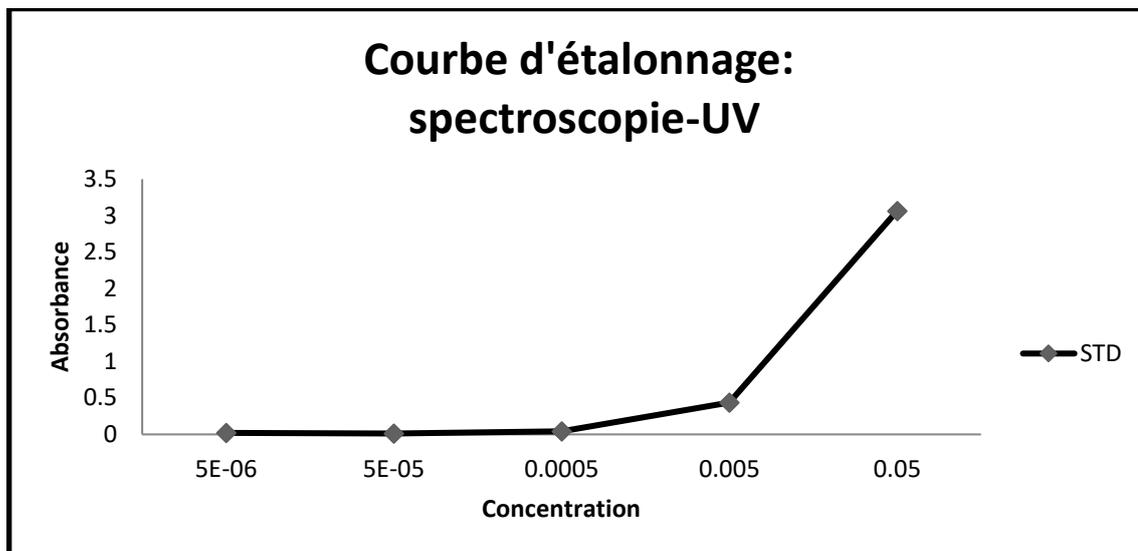


Figure 19 : Courbe d'étalonnage du STD metformine hydrochloride par spectroscopie UV.

Pour que la loi de Beer-Lambert soit vérifiée, les valeurs de l'absorbance (A) doivent être inférieures ou égales à l'unité ($A \leq 1$) car au-delà, d'autres interférences entrent en jeu,

Cela nous a emmené à tracer la courbe de tendance *linéaire de l'étalonnage* par spectroscopie-UV basée sur les concentrations ayant données des absorbances égales ou inférieures à un (1)

La courbe correspondante est aussi faite par Excel en mentionnant le coefficient de détermination (R^2) sur le graphique. Elle est représentée dans la *Figure -20-* suivante :

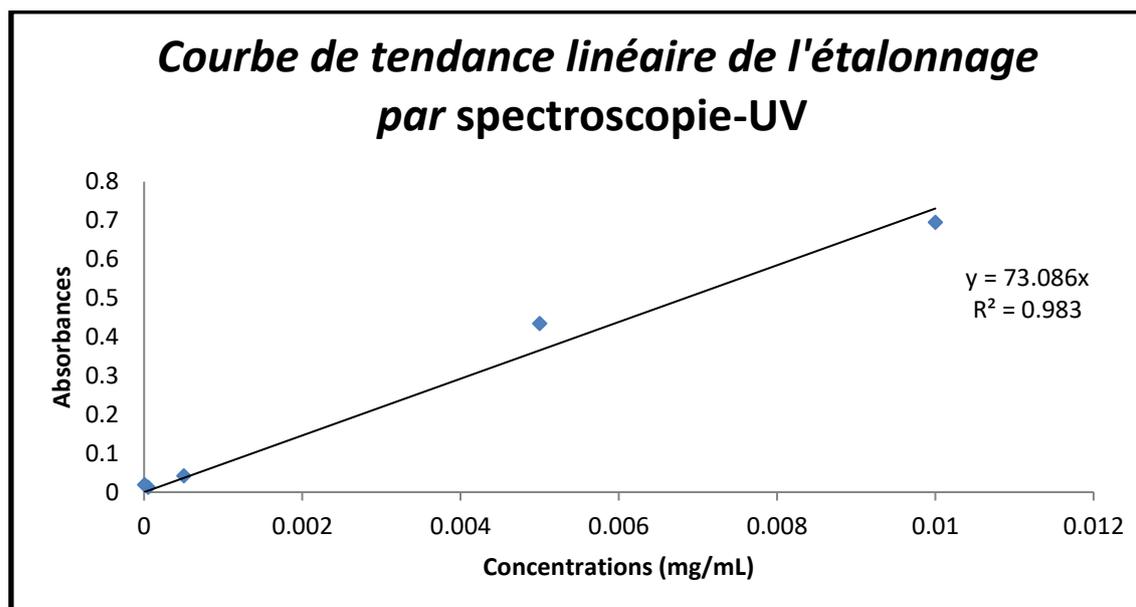


Figure 20 : Courbe de tendance linéaire de l'étalonnage par spectroscopie UV.

- **Commentaires :**

Pour des valeurs ascendantes de concentrations, on remarque que l'absorbance augmente, la proportionnalité A/C est de ce fait vérifiée : la méthode est linéaire et le facteur de calibration est la pente de la droite d'étalonnage (a=73.08). 3

Un coefficient de détermination $R^2=0,987$ proche de un (01) signifie que le pourcentage des variations de l'absorbance recouvre les variations des concentrations. En conséquence : la spectroscopie UV a une bonne sensibilité vis-à-vis des variations de concentrations.

I-1-2- Résultats de l'analyse quantitative des PF par spectroscopie UV :

Les **Tableaux -07-08-09-** résumant tous les résultats relatifs à l'analyse par spectroscopie UV, les prises d'essai des STD, les prises d'essai des PF et leurs masses moyennes. Seules les moyennes des absorbances et des teneurs sont représentées. Dans la dernière case de chaque tableau les produits sont dits Conformés (C) / Non Conforme (NC)

Les concentrations unitaires en mg/cp ont été déterminées par la relation :

$$C = \text{Titre}_{STD} \frac{PE_{STD} A_{éch}}{PE_{éch} A_{moySTD}}$$

Où :

C : est la concentration unitaire de la metformine hydrochloride en mg/cp.

PE_{STD} : la prise d'essai du standard en mg

PE_{éch} : la prise d'essai de l'échantillon

A_{éch} : Absorbance de l'échantillon

A_{moy STD} : Absorbance moyenne du standard

Tableau 7 : Résultats de la spectroscopie UV des PF 500 de Metformine Hydrochloride.

Dosage	PF	PE STD	PE moy éch	A moy STD	A moy éch	MM (mg/cp)	T moy (mg)	Produit
500 mg	01	100,00	106,20	0,7918	0,7886	528,74	492,40	C _f
	02	100,00	106,40	0,7859	0,7843	531,03	494,90	C _f
	03	100,10	106,00	0,7835	0,7891	529,73	500,50	C _f
	04	99,90	105,90	0,8005	0,8048	529,24	498,50	C _f
	05	100,10	105,90	0,7998	0,8022	529,38	498,40	C _f
	06	100,00	106,00	0,7881	0,7887	530,51	497,60	C _f
	07	100,20	106,50	0,7943	0,7899	533,33	495,50	C _f
	08	100,20	106,20	0,7943	0,8015	530,75	502,00	C _f

Tableau 8 : Résultats de la spectroscopie UV des PF 850 de Metformine Hydrochloride.

Dosage	PF	PE STD	PE moy éch	A moy STD	A moy éch	MM (mg/cp)	T moy (mg)	Produit
PF 850	09	100,00	106,70	0,6958	0,6971	885,00	833,39	C _f
	10	100,98	107,00	0,7868	0,7967	885,17	848,28	C _f
	11	100,98	107,30	0,7868	0,7921	885,41	841,30	C _f
	12	100,00	106,80	0,6958	0,6896	880,40	819,37	C _f
	13	100,98	106,80	0,7868	0,8088	896,38	873,76	C _f
	14	100,98	107,50	0,7868	0,8016	899,62	863,45	C _f

Tableau 9 : Résultats de la spectroscopie UV des PF 1000 de Metformine Hydrochloride.

Dosage	PF	PE STD	PE moy éch	A moy STD	A moy éch	MM (mg/cp)	T moy (mg)	Produit
PF 1000	15	100,00	106,30	0,7902	0,7928	1071,41	1004,15	C _f
	16	100,00	106,30	0,7831	0,7825	1077,34	1006,05	C _f
	17	100,00	107,40	0,7926	0,7922	1074,76	993,20	C _f
	18	100,00	107,80	0,7841	0,7826	1078,64	992,10	C _f
	19	100,00	107,60	0,7841	0,7832	1078,18	993,78	C _f
	20	100,00	106,30	0,7858	0,7794	1082,50	1003,00	C _f
	21	100,10	106,10	0,797	0,7911	1082,27	1006,98	C _f
	22	99,90	106,00	0,7962	0,7925	1080,74	1007,08	C _f
	23	99,90	105,80	0,7962	0,7880	1078,37	1001,08	C _f
	24	100,10	106,10	0,7779	0,7788	1080,25	1013,18	C _f
	25	100,00	107,70	0,8051	0,8050	1078,33	994,05	C _f
	26	99,90	106,00	0,8031	0,8041	1076,86	1009,50	C _f
	27	100,30	100,00	0,7535	0,7535	1081,35	994,80	C _f
	28	100,00	102,60	0,77	0,7681	1021,60	1036,34	C _f
29	100,00	104,10	0,7	0,7245	1042,60	1029,84	C _f	

A partir des données brutes des trois *Tableaux -07-08-09-*, les absorbances des PF des trois (03) dosages et leurs concentrations unitaires sont représentés par des diagrammes, suivis de courbes des absorbances en fonction des concentrations $y = A(C)$.

I-1-2-1- Les graphes des PF 500 mg :

Les moyennes des absorbances des PF 500 ainsi que leurs concentrations unitaires (mg/cp) correspondantes sont représentées séparément dans les diagrammes suivants (*Figure-21- ; Figure-22-*) :

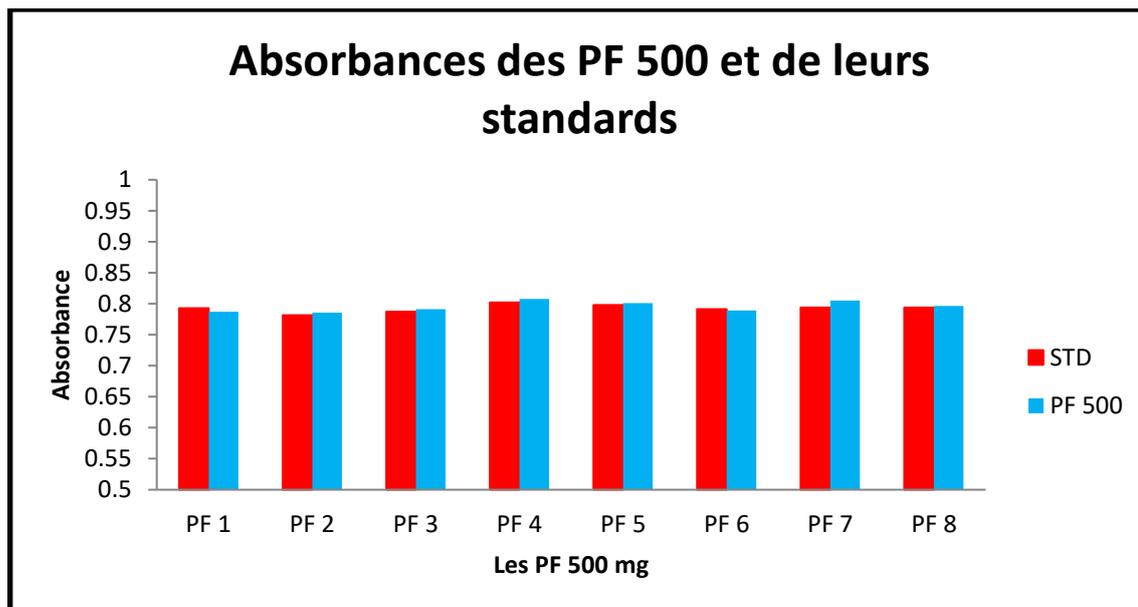


Figure 21 : Les absorbances des PF 500 et de leurs standards

- Commentaires :

D'après la *Figure-21-*, nous remarquons que la moyenne des absorbances de chaque échantillon des PF 500 est en corrélation avec la moyenne de l'absorbance du standard lancé au même temps que celui-ci. Le *Tableau -10-* résume la discussion de ces résultats :

Tableau 10 : Discussion des absorbances obtenues des PF 500

$A_{\min}PF\ 500$	$A_{\max}PF\ 500$	$A_{\text{moy}}PF\ 500$
0.784	0.805.	0.79

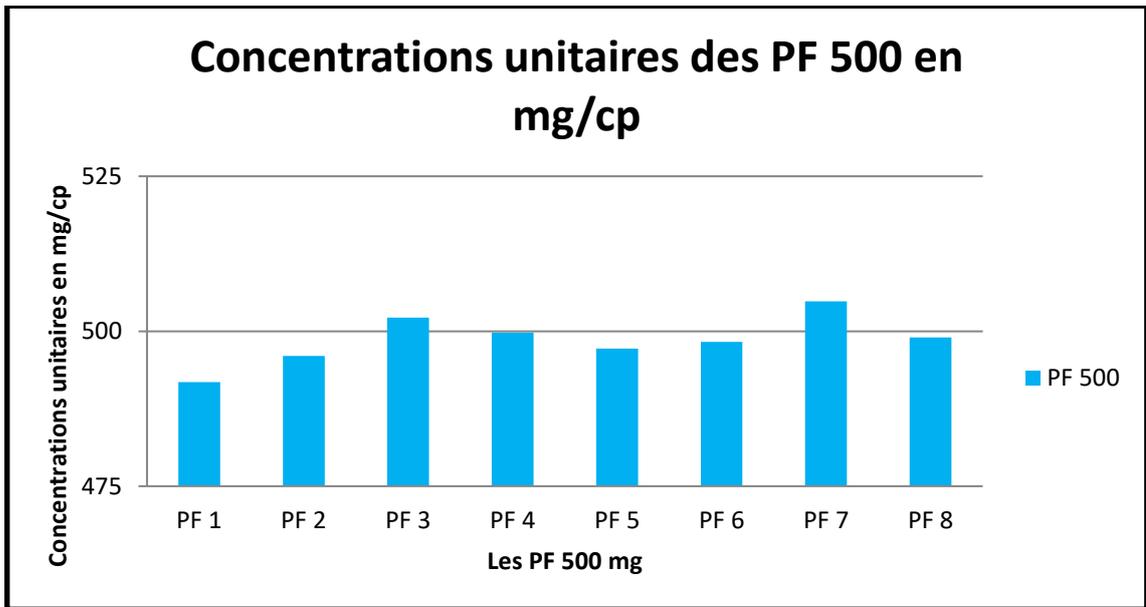


Figure 22 : Les Teneurs moyennes en mg/cp des PF 500 mg de Metformine Hydrochloride

- Commentaires : Le *Tableau -11-* résume les données de la *Figure-22-* :

Tableau-11- : Discussion des concentrations calculées des PF 500

C_{min} (mg/cp)	C_{max} (mg/cp)	Valeur Normale (mg/cp)	Produit
492.4	502	[475-525]	C_f

En traçant la courbe des absorbances en fonction des concentrations unitaires $y=A(C)$, on a obtenu le tracé de *la Figure-23-* :

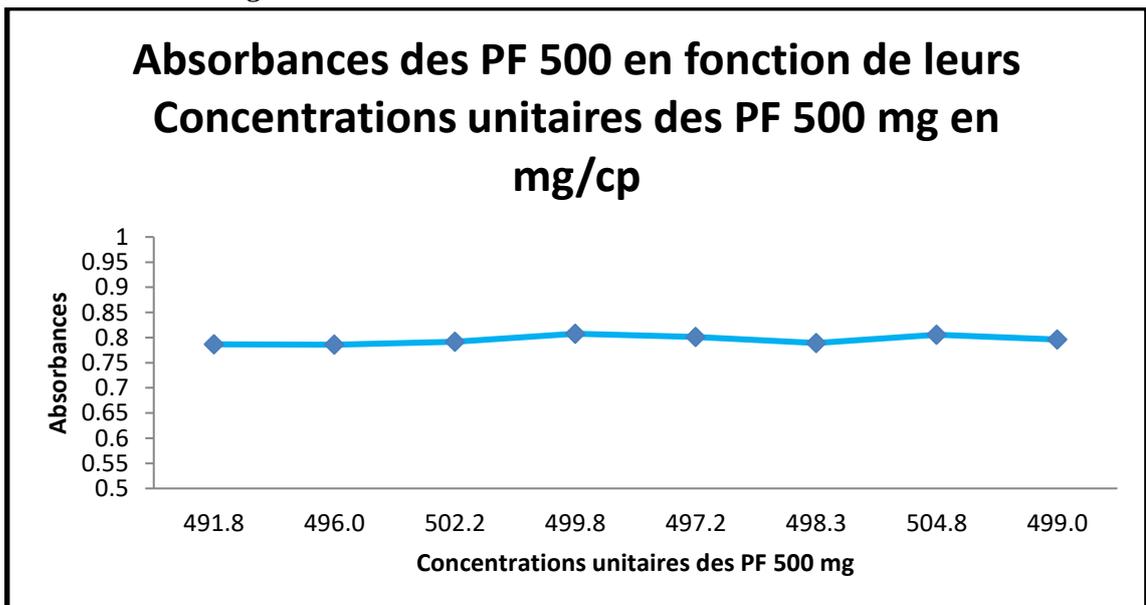


Figure 23 : Courbe des absorbances des PF 500 en fonction de leurs Concentrations unitaires en mg/cp

- Commentaires :

On remarque une proportionnalité entre les absorbances et les concentrations correspondantes. La loi de Beer-Lambert est ainsi respectée. La spectroscopie est une méthode linéaire.

I-1-2-2- Les graphes des PF 850 mg :

La *Figure -24-* présente les résultats de l'analyse spectroscopique par UV de deux PF 850 :

Wavelength program - Lambda 25 mardi 20 mars 2018 14:22 Temps universel coordonné

Data table

Sample ID	Description	
		232.0
STD-01		0.6935
STD-02		0.6971
STD-03	CP 850	0.6968
PF-09-01		0.6970
PF-09-02		0.6972
PF-12-01		0.6898
PF-12-02		0.6894

Figure 24 : les absorbances de deux PF 850 mg analysés par UV

A partir des absorbances obtenues, les concentrations des PF 850 ont été calculées, et les graphes des absorbances et des concentrations sont faits. (*Figures -25- et -26-*)

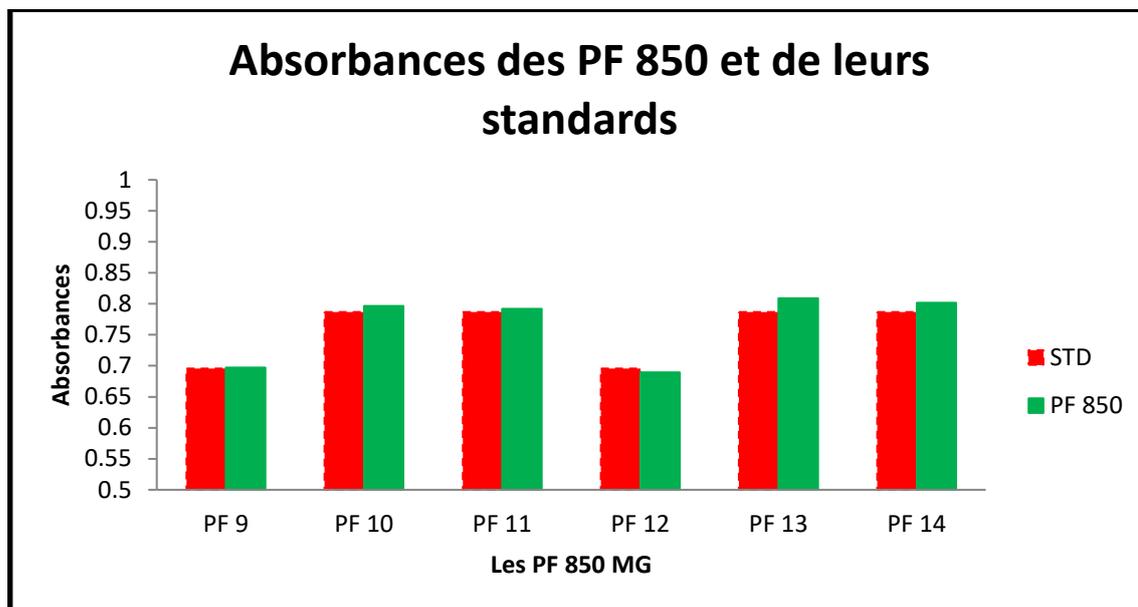


Figure 25 :Diagramme des absorbances moyennes des PF 850 et de leurs STD

- **Commentaires :**

D'après la *Figure-25-*, nous constatons que la moyenne des absorbances de chaque échantillon est proche de celle de son standard, elles sont toutes aux environs de 0.76.

Le *Tableau -12-* résume les données de la figure précédente :

Tableau 12 : Discussion des absorbances obtenues des PF 850

A_{\min} PF 850	A_{\max} PF 850	A_{moy} PF 850
0.690	0.809	0.76

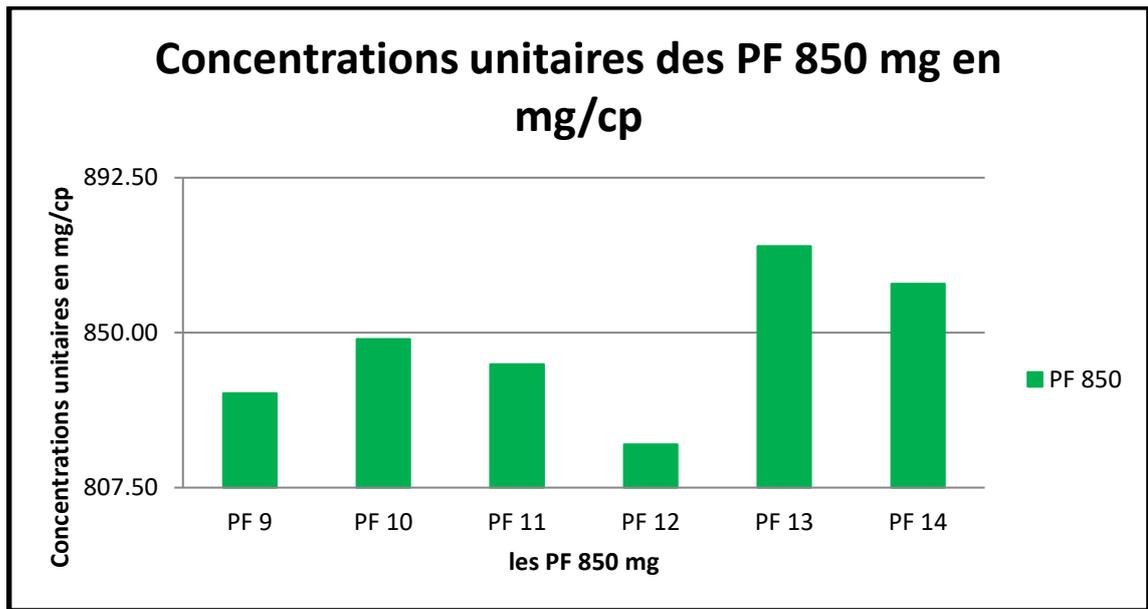


Figure 26 : Concentrations des PF 850

Commentaires :

Les données de la figure 26 sont résumées dans le *Tableau -13-*:

Tableau 13 : Discussion des concentrations calculées des PF 850.

C_{min} (mg/cp)	C_{max} (mg/cp)	Valeur Normale (mg/cp)	Produit
819.37	873.76	[807.5-892.5]	Conforme

La courbe de la **Figure -27-** montre les absorbances des PF 850 mg en fonction des concentrations des échantillons dosés :

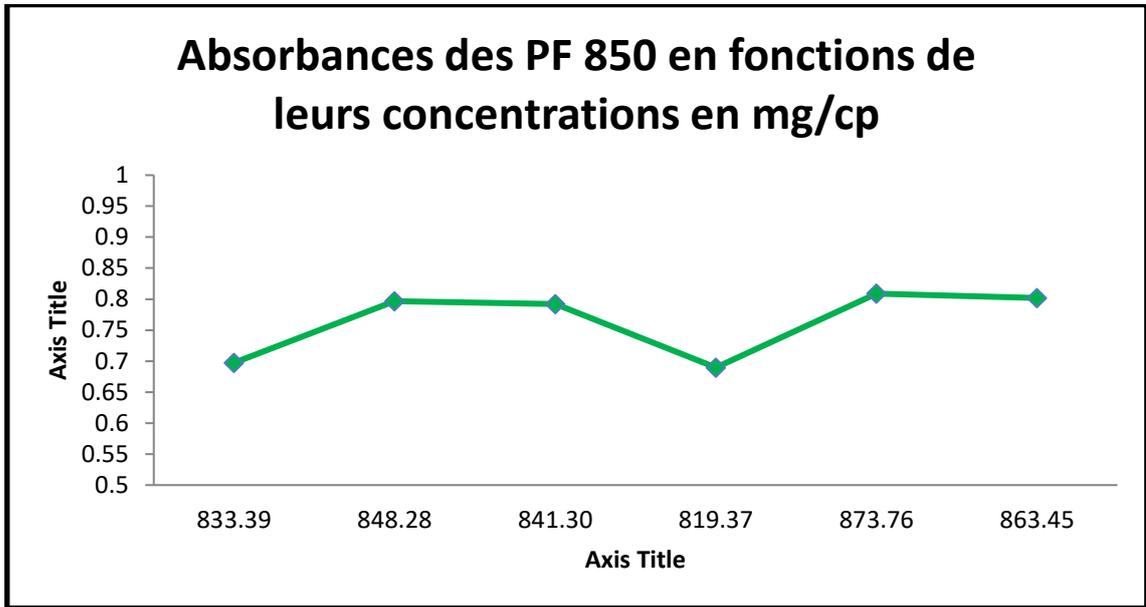


Figure 27 : Absorbances des PF 850 en fonction de leurs concentrations

- **Commentaires :**

La courbe A(C) des PF 850 mg analysée n'est pas une droite, et ce peut être dû à des erreurs aléatoires, les valeurs obtenues sont tout de même dans l'intervalle.

I-1-2-3- Les graphes des PF 1000 mg :

Les moyennes des absorbances des PF 1000 ainsi que leurs concentrations unitaires (mg/cp) correspondantes sont représentées dans les diagrammes suivants (**Figures -28-et -29-**) :

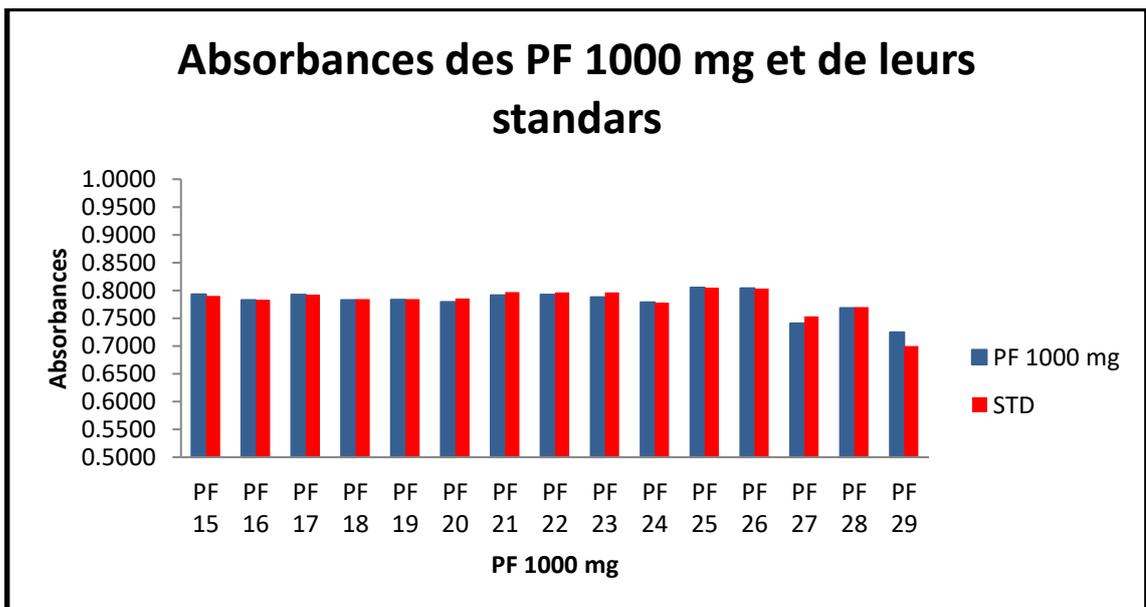


Figure 28 : Absorbances des PF 1000 mg et de leurs STD

- **Commentaires :**

Le **Tableau -14-** reprend les données de la figure précédente :

Tableau 14 : Discussion des absorbances obtenues des PF 1000

A_{\min} PF 1000	A_{\max} PF 1000	A_{moy} PF 1000
0.725	0.805	0.79

La **Figure -29-** montre les concentrations calculées à partir des absorbances obtenues des PF 1000 mg :

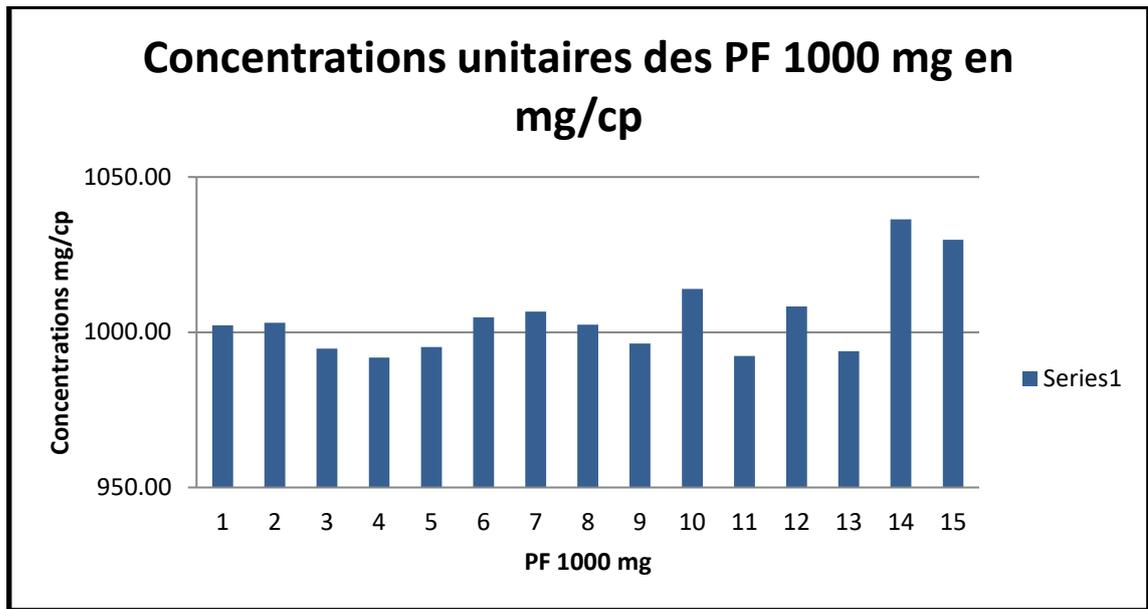


Figure 29 : Concentrations des PF 1000 mg dosés

- **Commentaires :**

Les données observées à partir de la **Figure -29-** sont mises dans le **Tableau -15-** :

Tableau 15 : Discussion des concentrations calculées des PF 1000.

C_{\min} (mg/cp)	C_{\max} (mg/cp)	Valeur Normale (mg/cp)	Produit
991,85	1036,34	[950-1050]	Conforme

La **Figure-30-** donne la courbe des absorbances des PF 1000 mg en fonction de leurs concentrations :

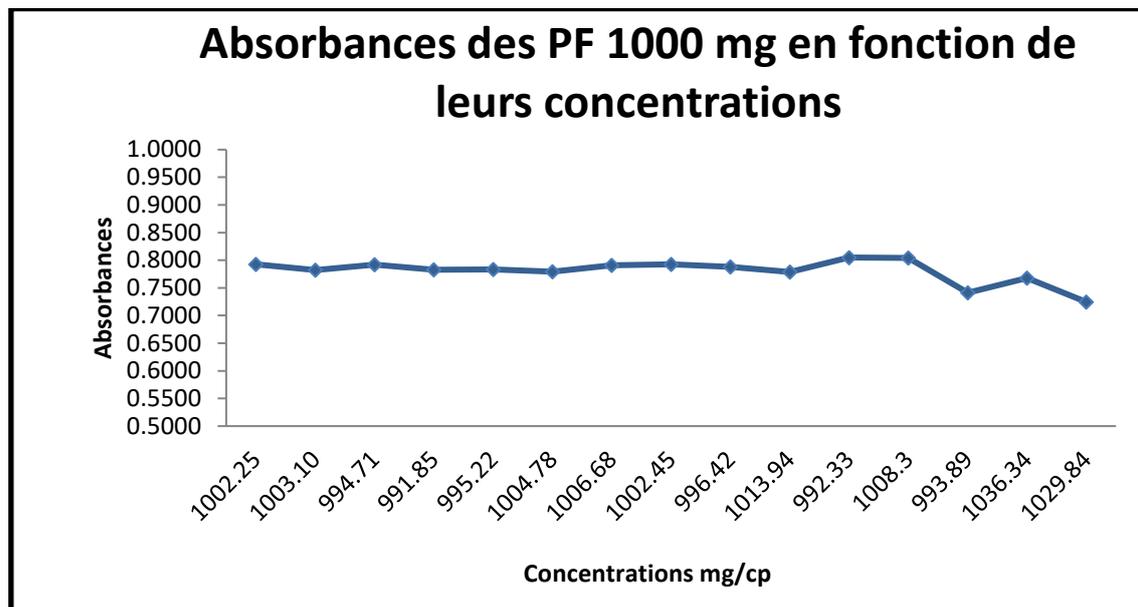


Figure 30 : Courbes des absorbances en fonction des Concentrations des PF 1000 mg.

- **Commentaires :**

Pour les PF 1000 mg, l'absorbance varie dans le même sens que la concentration. Les produits 1000 mg sont tous conformes et leurs concentrations se trouvent dans l'intervalle des valeurs normales.

En se basant sur tous les résultats obtenus, les écarts types relatifs (*Related Standard Deviation %*) RSD% des absorbances sont calculés à l'aide de l'Excel et ils sont résumés dans le **Tableaux -16-, -17- et -18-** suivants :

Tableau 16 : RSD% des absorbances des PF 500 mg de metformine hydrochloride

Dosage	Désignation PF	% RSD A
PF 500	01	0,28
	02	0,25
	03	0,42
	04	0,35
	05	0,11
	06	0,13
	07	2,49
	08	0,57

Tableau 17 : RSD% des absorbances des PF 850 mg de metformine hydrochloride

Dosage	Désignation PF	% RSD A
PF 850	09	0,02
	10	0,22
	11	0,20
	12	0,04
	13	1,59
	14	0,00

Tableau 18 : RSD% des absorbances des PF 1000 mg de metformine hydrochloride

Dosage	Désignation PF	% RSD A
PF 1000	15	0,20
	16	0,30
	17	0,15
	18	0,14
	19	0,19
	20	0,23
	21	0,23
	22	0,33
	23	0,44
	24	0,20
	25	0,13
	26	0,25
	27	0,07
28	2,69	
29	0,74	

- **Commentaires :**

Pour tous les PF analysés par spectroscopie, les RSD% des absorbances sont en majorité au-dessous de 2 : pour 29 PF on a seulement 2 qui ont des RSD aux alentours de 2.5. La précision de la méthode est ainsi garantie et la répétabilité et la reproductibilité des résultats d'analyse quantitative par spectroscopie sont assurées.

I-2- Analyse qualitative par spectroscopie UV : Les Balayages

Dans le cadre d'examiner l'aspect qualitatif de la spectroscopie UV, nous avons effectué des balayages allant de 205 ou 210 nm jusqu'à 240 ou 260 nm, intervalle dans lequel la metformine hydrochloride absorbe intensivement. Dans cet intervalle, l'énergie lumineuse que consomme la lampe est très élevée, elle risque d'être rapidement épuisée comparant à une analyse quantitative à longueur d'onde fixe

Le balayage est fait sur deux (02) MP, deux (02) PF 500 mg, deux (02) PF 850 mg et un PF 1000 mg fait trois (03) fois : en intra-jour et en inter-jour.

On a dans les **Figure -31- à -38-** le spectre d'absorption d'un PF de chaque dosage avec la MP correspondante à celui-ci, et du PF 1000 choisi pour illustrer l'analyse, le reste des spectres d'absorption se trouve en Annexe [XIII].

I-2-1- Balayage de la MP 01 :

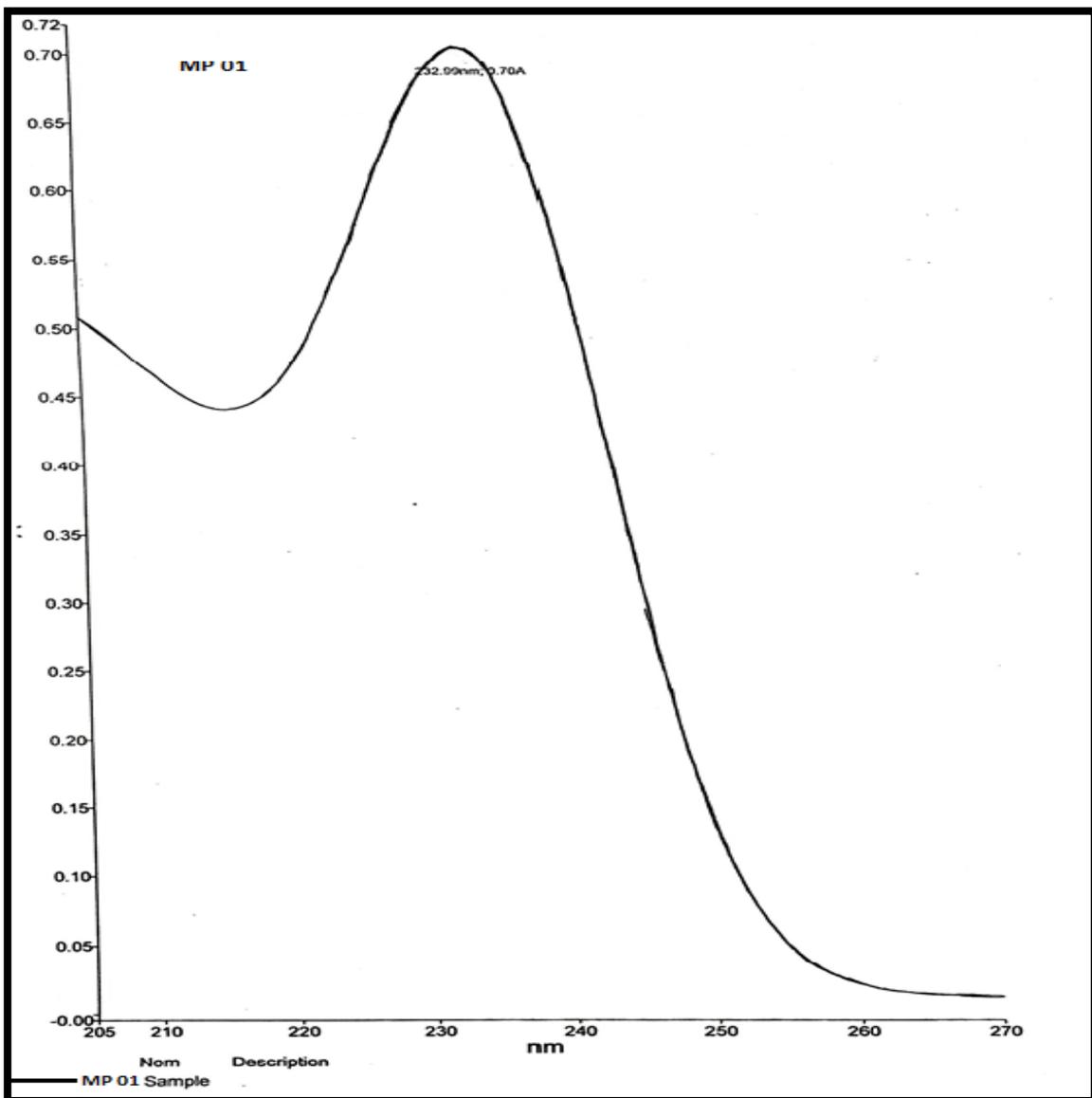


Figure 31 : Spectre d'absorption de la MP 01 :

I-2-2- Balayage d'un PF 850-09 :

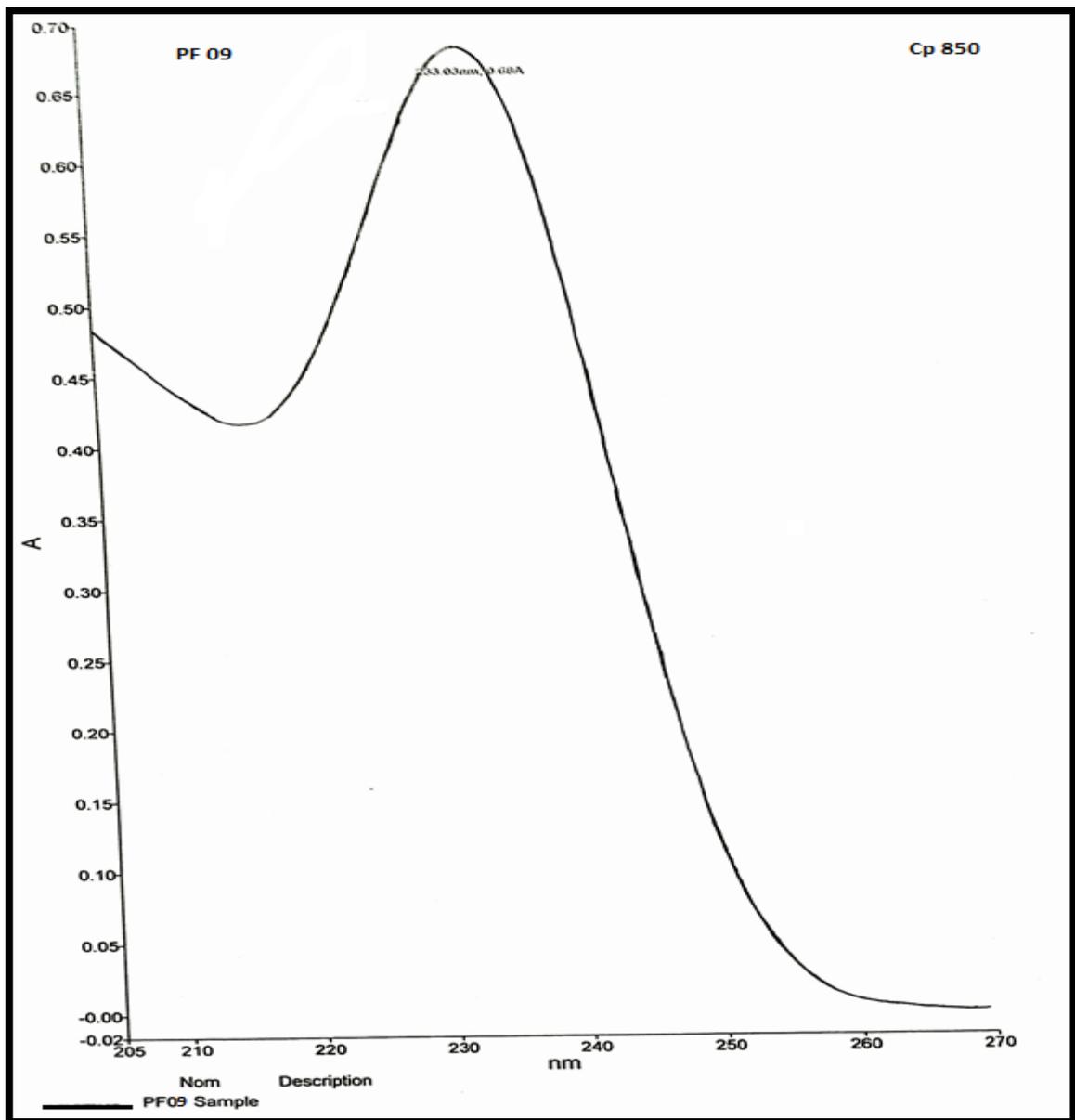


Figure 32 : Balayage d'un PF 850 mg (PF 09)

- Commentaires :

Nous remarquons la même allure du spectre d'absorption de la MP 01 et de son PF, ils sont superposables. Il s'agit de la même substance : Metformine hydrochloride.

I-2-3- Balayage MP 02 :

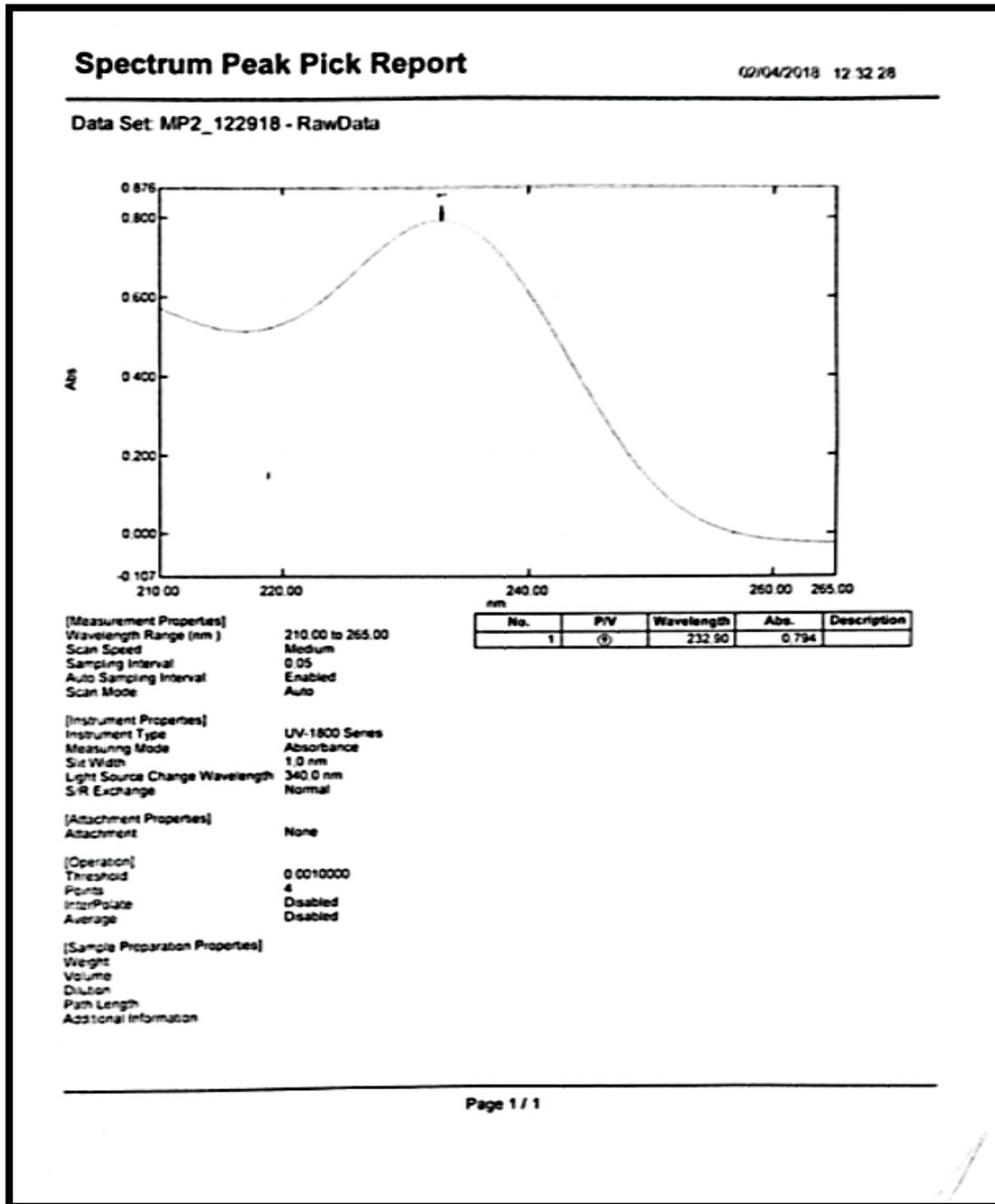


Figure 33 : Balayage de la MP 02

I-2-4- Balayage PF 500-07 :

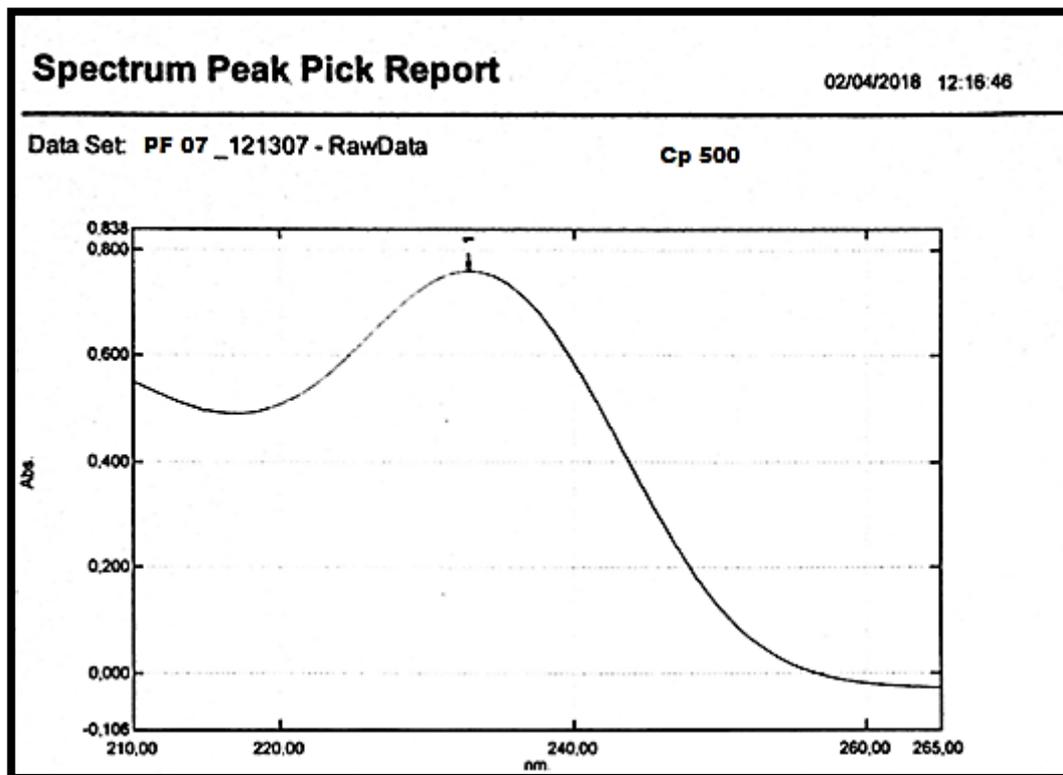


Figure 34 : Balayage d'un PF 500 mg (PF 07)

- **Commentaires :**

Le balayage de la MP 02 et de son PF donnent deux spectres de la même tendance, l'identité de la metformine hydrochloride est ainsi vérifiée.

Des analyses qualitatives intra-jour et inter-jour ont été réalisées sur un PF 1000 mg (PF 26). Les spectres obtenus sont dans les *Figures -35- ; -36- et -37-* :

I-2-5- 1^{er} Balayage PF 1000-26 :

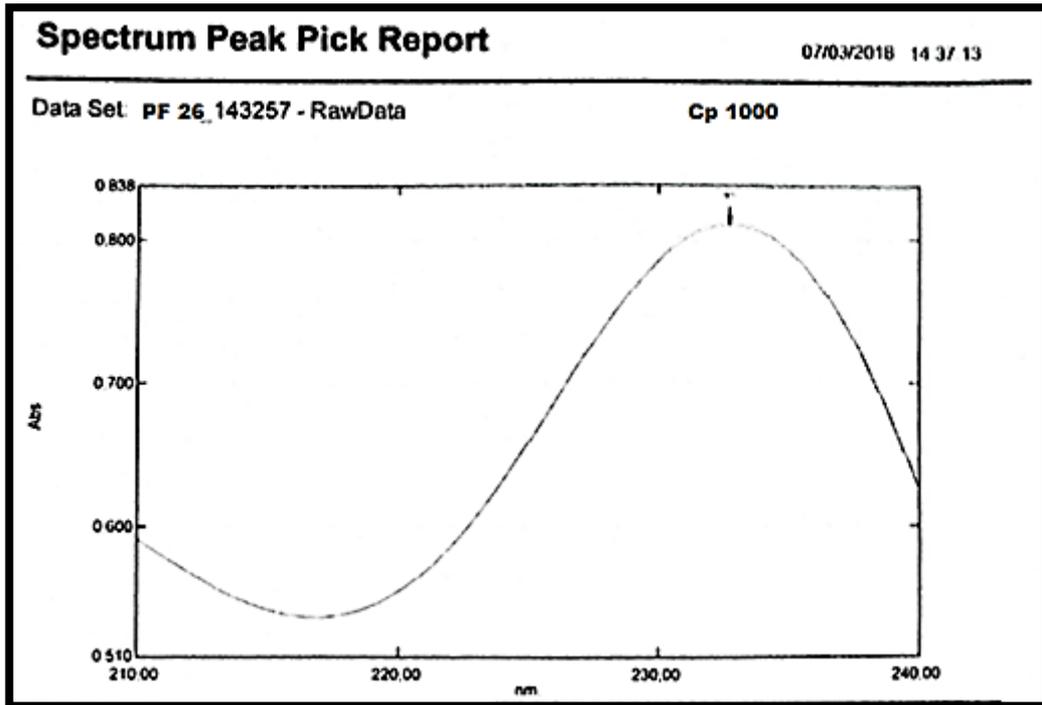


Figure 35 : 1^{er} balayage du PF 26

I-2-6- 2^{ème} balayage du PF 1000-26

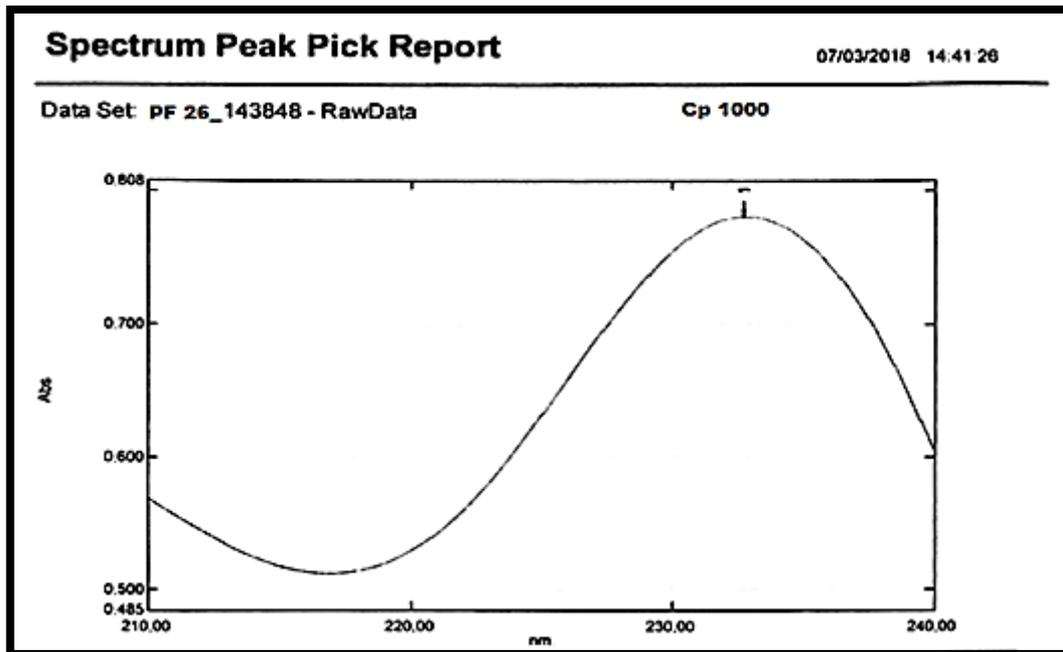
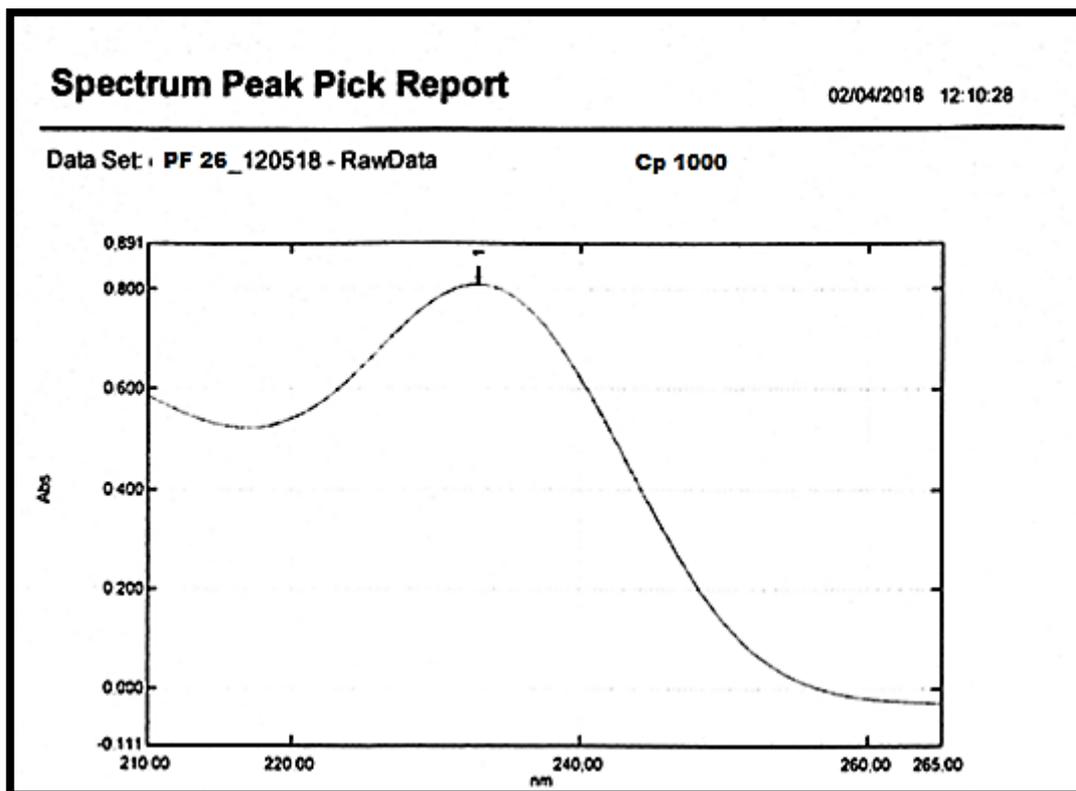


Figure 36 : 2^{ème} balayage du PF 26

I-2-7- 3^{ème} balayage PF 1000-26 :Figure 37 : 3^{ème} balayage du PF 26

Les résultats obtenus ainsi que les écarts entre la longueur d'onde du maximum d'absorption entre chaque PF et son MP correspondante sont résumés dans le *Tableau -19- et -20-* :

Tableau 19 : Tableau des longueurs d'onde maximales d'absorption de la MP 01 et de ses PF:

Produit	λ_{\max}	Écartype
MP 01	232,99	/
PF 09	233,03	0,02828
PF 12	233,07	0,05656

Tableau 20 : Tableau des longueurs d'onde maximales d'absorption le la MP 01 et de ses PF

Produit	λ_{\max}	Écartype
MP 02	232,9	/
PF 07	232,85	0,0353
PF 08	232,9	0
PF 12	232,95	0,0353

- **Commentaires :**

Les PF analysés ont un maximum d'absorption très proche des maximums d'absorption de leurs MP correspondantes. Les écartypes des λ_{\max} entre chaque PF et son MP correspondante sont proches du zéro. La superposition des spectres montre la possibilité d'identifier la metformine hydrochloride en comparant le spectre d'absorption obtenu par un balayage avec un spectre de référence.

Le PF 1000 mg, choisi pour tester la répétabilité et la reproductibilité des résultats du balayage, il a été lancé deux (02) fois le même jour, et une autre fois à un intervalle de un (01) mois. Les longueurs d'onde maximales obtenues, l'écartype évaluant la répétabilité et le RSD% évaluant la reproductibilité sont mis dans le *Tableau -21-* :

Tableau 21 : tableau des RSD% d'un PF 1000 mg

Paramètre	Intra-jour		Ecartype	Inter-jour		RSD%
λ_{\max}	232,7	232,7	0,00	232,7	232,95	0,076

- **Commentaires :**

En répétant le balayage dans le même jour, la longueur d'onde correspondante au maximum d'absorption était de la même valeur, ce qui confirme la répétabilité des résultats.

Le fait de répéter l'opération un autre jour, et avoir un RSD% de 0.076 permet de dire que les résultats sont reproductibles.

II- Résultats et discussions de l'HPLC :

Dans le but d'évaluer la méthode de dosage chromatographique, deux analyses par HPLC ont été effectuées à l'aide de deux appareils différents. On a au total six (06) PF représentatifs de l'ensemble lancé : deux (02) PF pour chaque dosage, en plus du STD fait pour chaque analyse.

Le STD est injecté six (06) fois et les PF quatre (04) fois, (l'injection répétée permet de réduire la variabilité [67]). La méthode de calibration utilisée est une méthode d'étalonnage externe dans laquelle l'étalon externe est une MP dont la pureté est de 100.29%. Les résultats sont présentés dans les bulletins d'analyse qui suivent (*Figures : -38- ; -39- ; -40- ; -41- et -42-*).

II-1- Résultats brut de l'analyse HPLC

II-1-1- HPLC du STD (HPLC 01) :

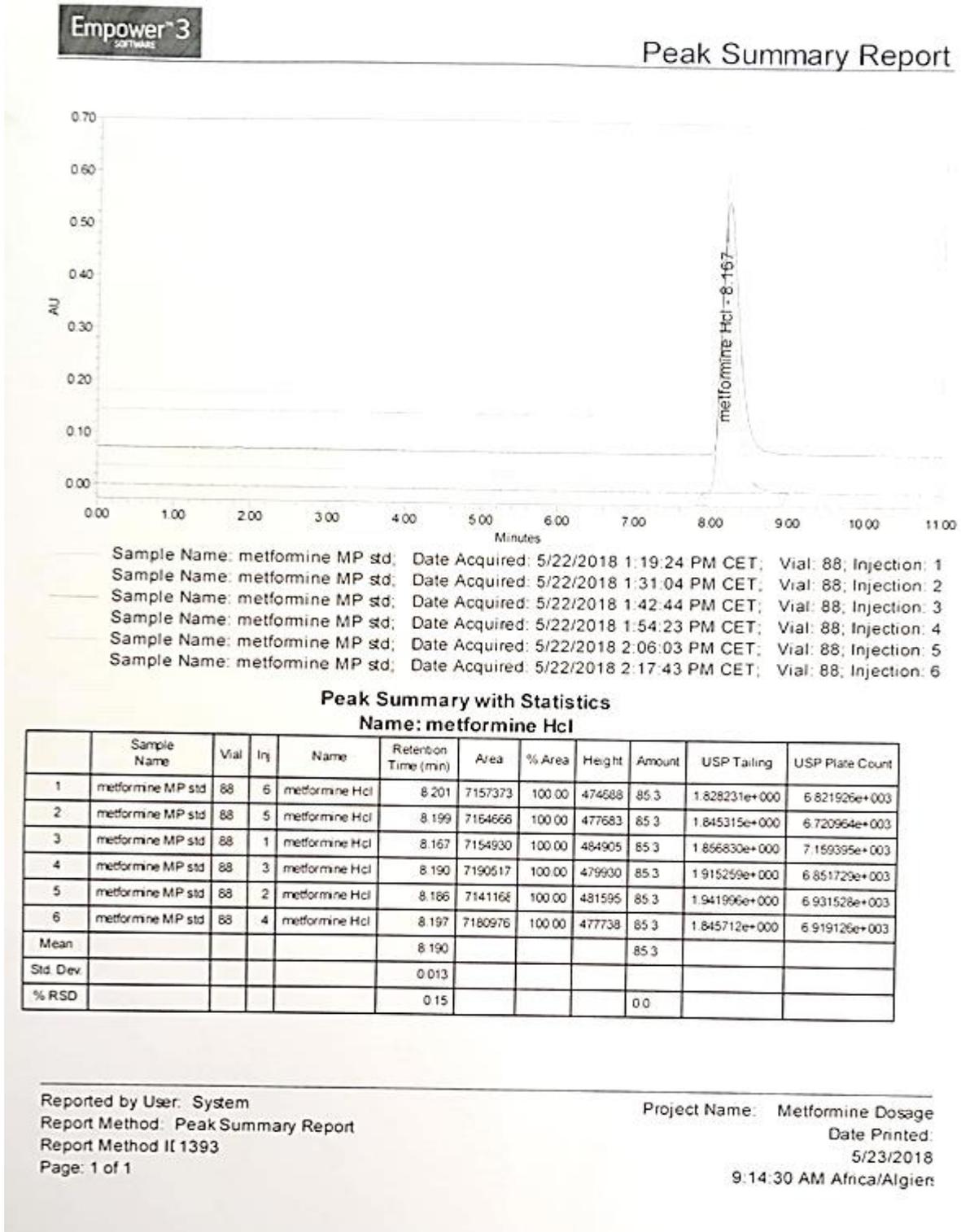


Figure 38 : Chromatogramme du STD (HPLC 01)

II-1-2- HPLC du PF 1000-28 (HPLC 01) :

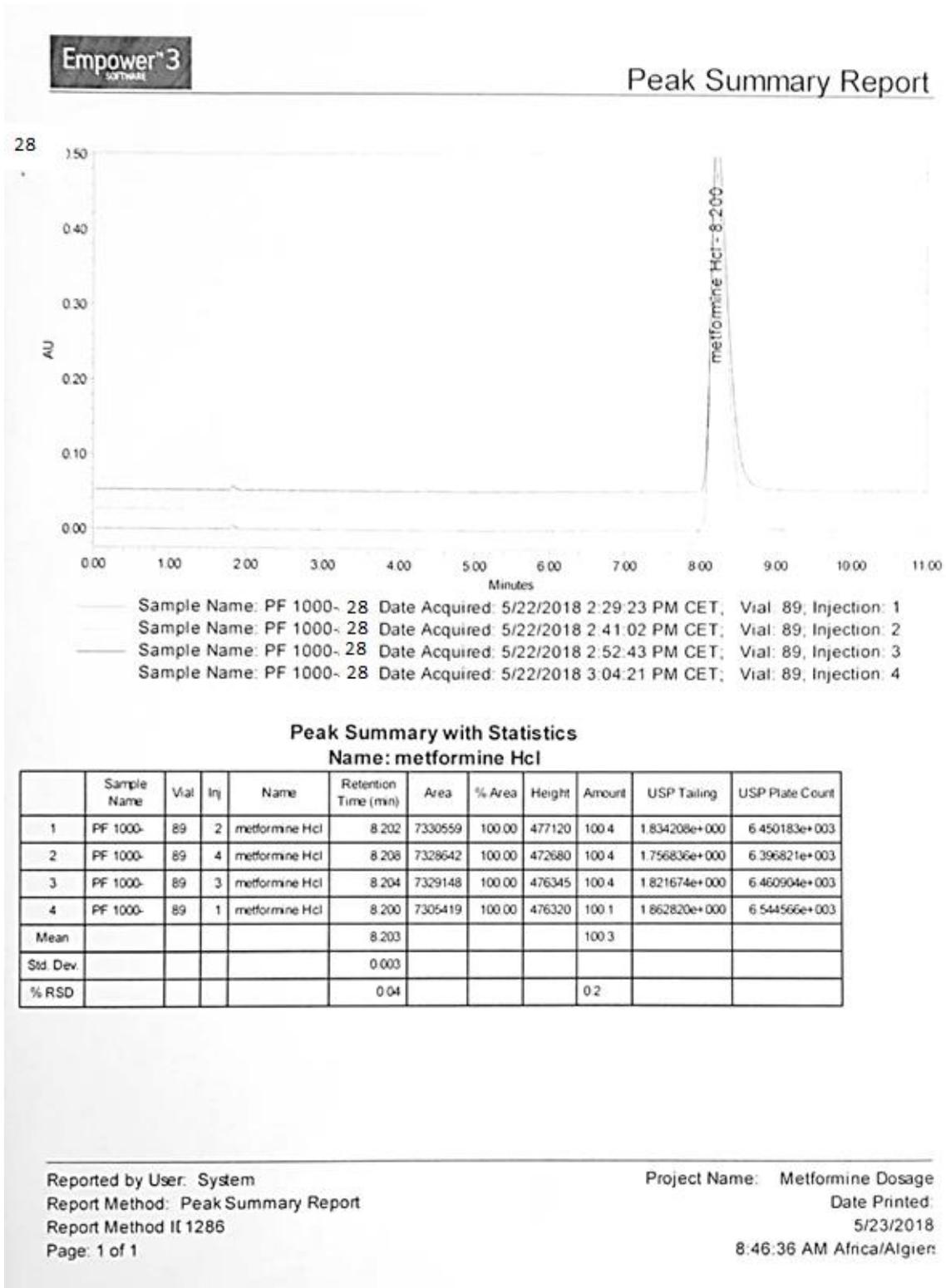


Figure 39 : Chromatogramme du PF 28 (HPLC 01)

II-1-3- HPLC du STD (HPLC 02) :

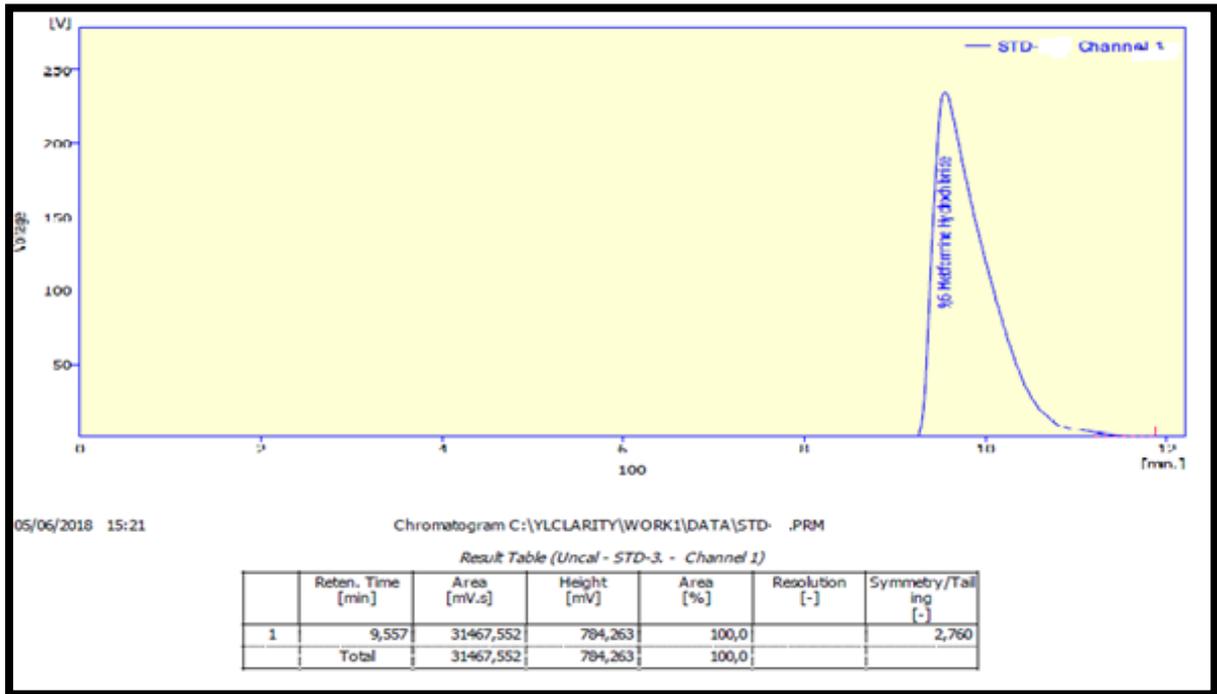


Figure 40 : Chromatogramme du STD (HPLC 02)

II-1-4- HPLC du PF 500-04 (HPLC 02) :

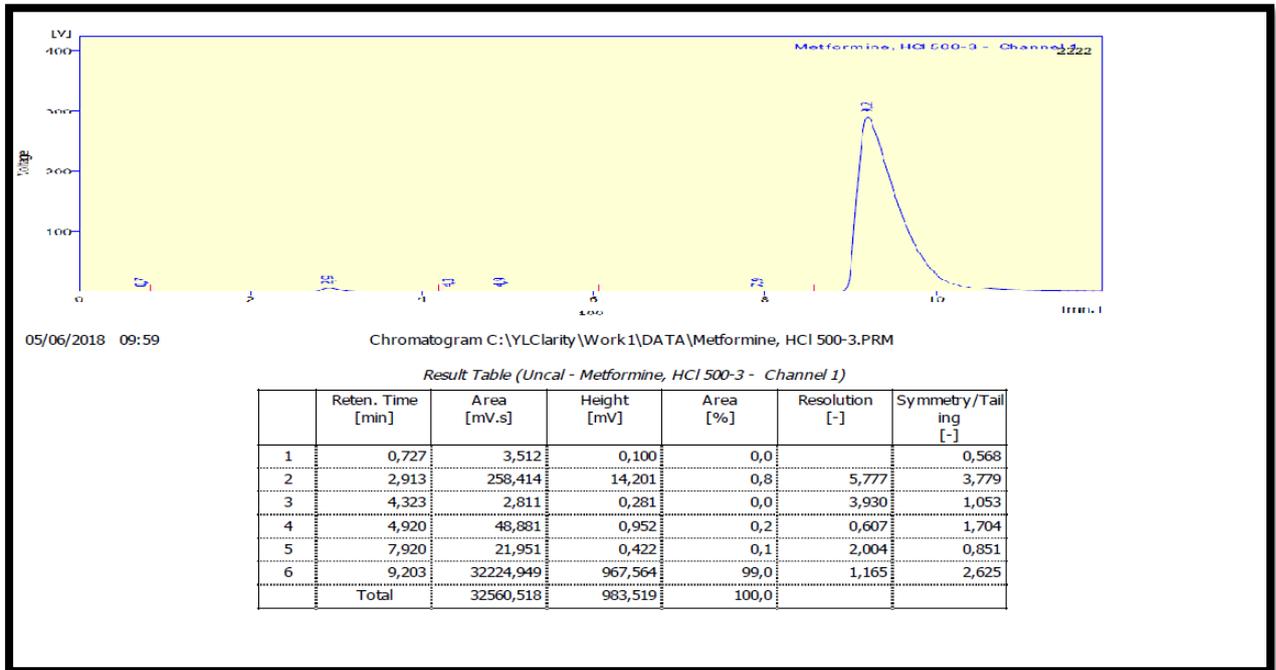


Figure 41 : Chromatogramme du PF 04 (HPLC 02)

II-1-5- HPLC du PF 850-13 (HPLC 02) :

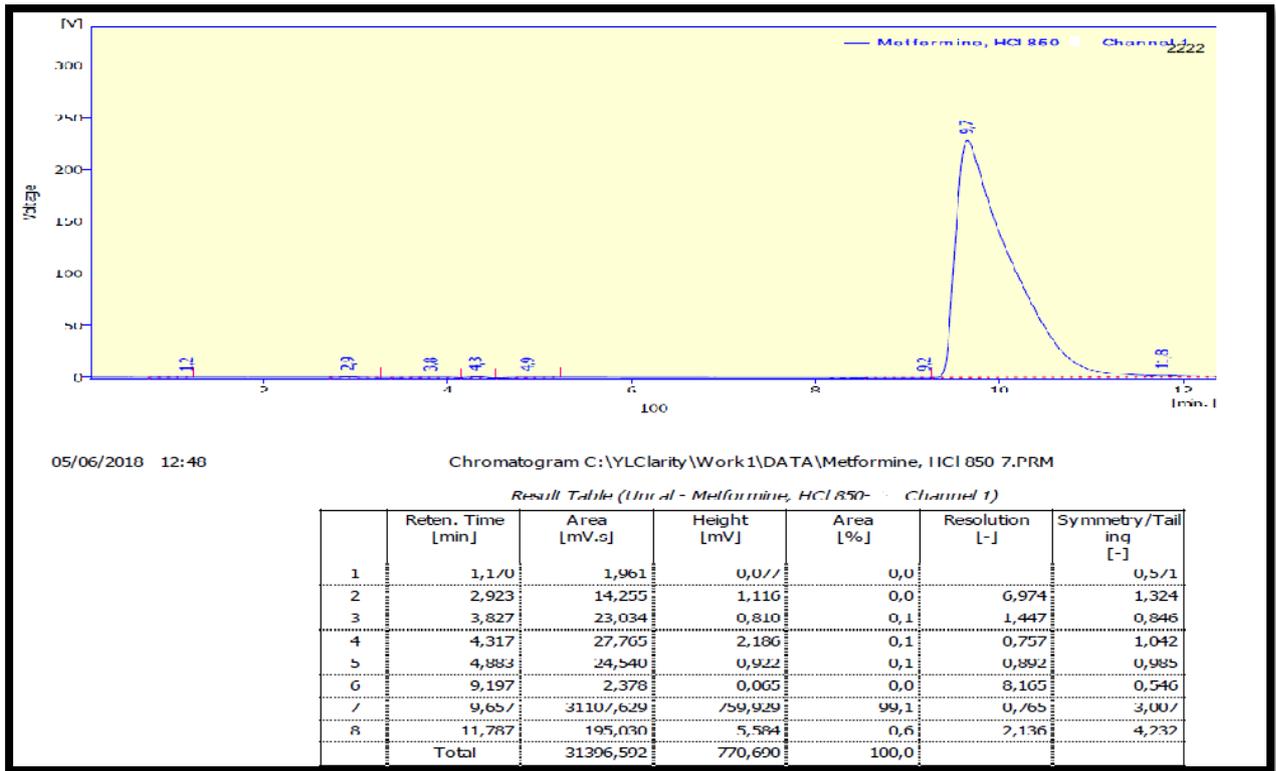


Figure 42 : Chromatogramme du PF 13 (HPLC 02)

II-2- Résultats de l'analyse quantitative par HPLC :

L'aspect quantitatif de l'HPLC repose sur la mesure des aires des pics. Les aires sont obtenues directement par le logiciel qui pilote le système, tandis que les teneurs sont calculées à l'aide de l'équation suivante :

$$C_e = \frac{Aire_{éch}}{Aire_{STD}} C_{STD}$$

Ci-après, sont présentés les graphes des aires des pics pour chaque dosage et leurs concentrations correspondantes (Figure -43- ; -44-) :

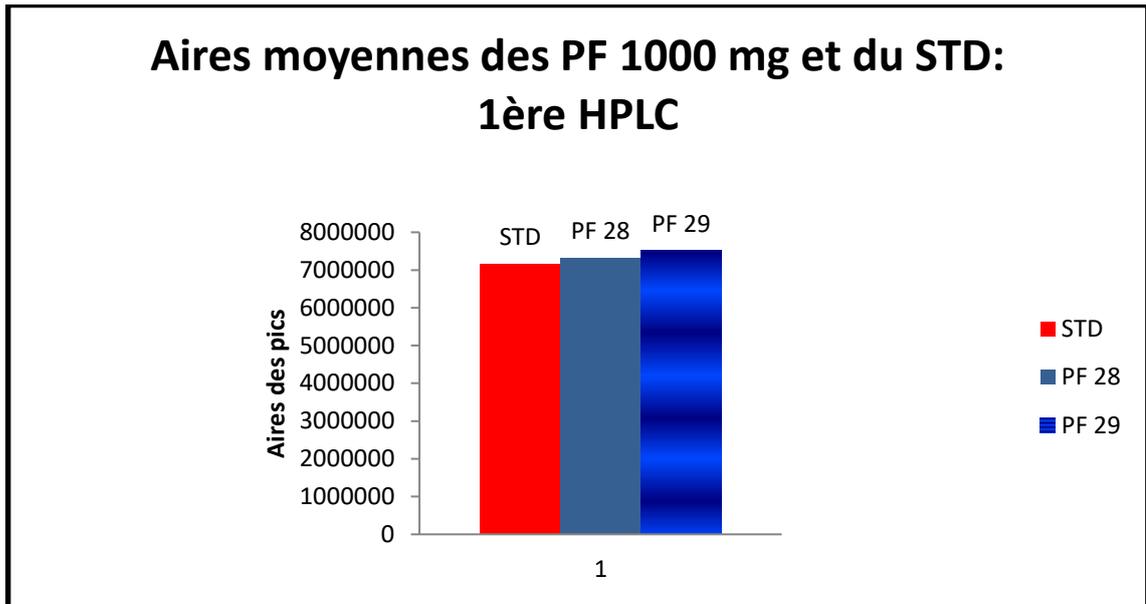


Figure 43 : Aires moyennes de deux PF 1000 et du STD

- Commentaires :

D'après la **Figure -43-**, on constate que pour des solutions du STD et de PF 1000 mg préparées à la même concentration (0.25 mg/mL), les moyennes des aires des pics obtenues par HPLC ont des valeurs très proches. La méthode HPLC est donc une méthode qui a une bonne exactitude.

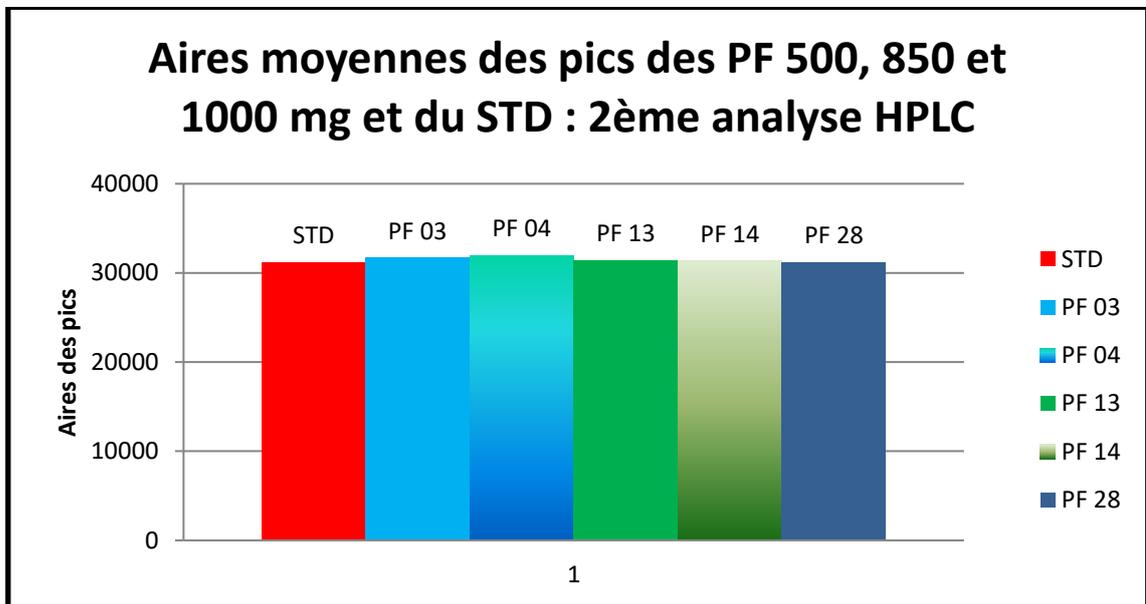


Figure 44 : Aires moyennes de quelques PF et du STD

- Commentaires :

Sur le graphique de la **Figure -44-**, et pour des PF de 3 dosages différents injectés à une même concentration (0.25 mg/mL), les moyennes des aires sont proches entre eux et à ceux du STD. L'HPLC s'est révélée exacte pour l'analyse des différents dosages de la metformine hydrochloride.

Le **Tableau -22-** résume les résultats des RSD% des aires des PF de la metformine hydrochloride :

Tableau 22 : RSD% des Aires des pics

Produit	RSD% Aires
MP 01 (1)	0,20
MP 01 (2)	1,96
PF 03	1,73
PF 04	0,62
PF 13	1,25
PF 14	0,86
PF 28	0,01
PF 29	0,18

- Commentaires :

On observe que les RSD des aires des pics sont inférieurs à 2 pour les six (06) injections du STD et les quatre (04) injections de chaque PF, ce qui reflète la répétabilité de la méthode HPLC.

Pour tester la reproductibilité de la méthode, un PF 1000 a été lancé (PF 29) dans deux laboratoires différents, l'un utilise un système d'auto-injection et l'autre utilise une injection manuelle à l'aide d'une boucle. Les RSD% sont calculés par Excel, et les résultats sont représentés dans le **Tableau-23-**:

Tableau 23 : Les RSD% des aires obtenu du PF 29.

PF 29	RSD% Aires
(1)	1,23
(2)	0,01

- Commentaires :

Les deux RSD sont inférieures à 2, la méthode est jugée reproductible. L'écart entre ces deux RSD peut être expliqué par les inconvénients de l'injection manuelle qui dépend de l'expérience du manipulateur ainsi que de la précision de la seringue d'injection. L'HPLC est une méthode fidèle, ayant une bonne répétabilité et reproductibilité.

II-3- Résultats de l'analyse qualitative par HPLC :

L'aspect qualitatif de l'HPLC repose sur la comparaison du t_R de l'échantillon à identifier à un t_R du STD lancés successivement. Les résultats sont regroupés dans le *Tableau -24- et -25-* .

- **La 1^{ère} analyse HPL C :**

Tableau 24 : RSD% de la 1^{ère} HPLC

Produit	RSD% t_R
MP 01	0,155
PF 28	0,024
PF 29	0,028

- **La 2^{ème} analyse HPLC :**

Tableau 25 : RSD% de la 2^{ème} HPLC

Produit	RSD% t_R
MP 01	0,949
PF 03	0,905
PF 04	2,428
PF 28	2,436
PF 13	0,466
PF 14	1,780

- **Commentaires :**

Pour la 1^{ère} analyse HPLC, on observe des RSD% des t_R des PF proches du RSD% du t_R STD, ils sont tous inférieure à 2. La comparaison des t_R PF et t_R STD metformine permet de dire qu'il s'agit bien de la metformine hydrochloride. C'est une méthode sélective qui peut détecter la présence de la metformine en présence d'autres interférences (les autres pics)

Dans la 2^{ème} analyse, la majorité des %RSD des t_R sont inférieurs à 2, et les valeurs excédant 2 peuvent être liées à l'injection manuelle.

III- Discussions globale des résultats obtenus par les deux méthodes :**III-1- Comparaisons des résultats obtenus par les deux méthodes:**

Dans une étude comparative de deux méthodes analytiques, la courbe de régression linéaire trouve sa place pour évaluer chaque méthode par rapport à l'autre. Pour tracer cette courbe : différents PF sont dosés par les deux méthodes et les résultats de l'une sont exprimés en fonction des résultats de l'autre méthode : pour notre cas la courbe a été tracé à l'aide de l'Excel dont nous avons mis les résultats de la spectroscopie en abscisse et ceux de l'HPLC en ordonnées. Le **Tableau -26-** résume les concentrations trouvées par chaque méthode :

Tableau 26 : Concentrations des PF par spectroscopie UV et HPLV-UV

PF	C _{moy} HPLC	C _{moy} SP	Dosage théorique (mg/cp)	Produit
04	513,60	498,5	500	C _f
08	510,81	502	500	C _f
13	848,43	873,76	850	C _f
14	857,59	863,45	850	C _f
28	1022,85	1036,34	1000	C _f
29	1048,86	1029,84	1000	C _f

- Commentaires :

Toutes les concentrations se trouvent dans l'intervalle des valeurs normales. Les concentrations obtenues par spectroscopie UV et HPLC-UV ne sont pas très différentes. Les PF sont conformes. Les concentrations étant proches du dosage du comprimé, les deux méthodes sont exactes.

Pour évaluer la corrélation existante entre les deux méthodes, nous avons procédé à tracer la courbe de régression linéaire en mettant les concentrations obtenues par spectroscopie-UV en abscisses et celles obtenues par HPLC en ordonnées. La courbe est faite à l'aide de l'Excel et elle est comme suit (*Figure -45-*) :

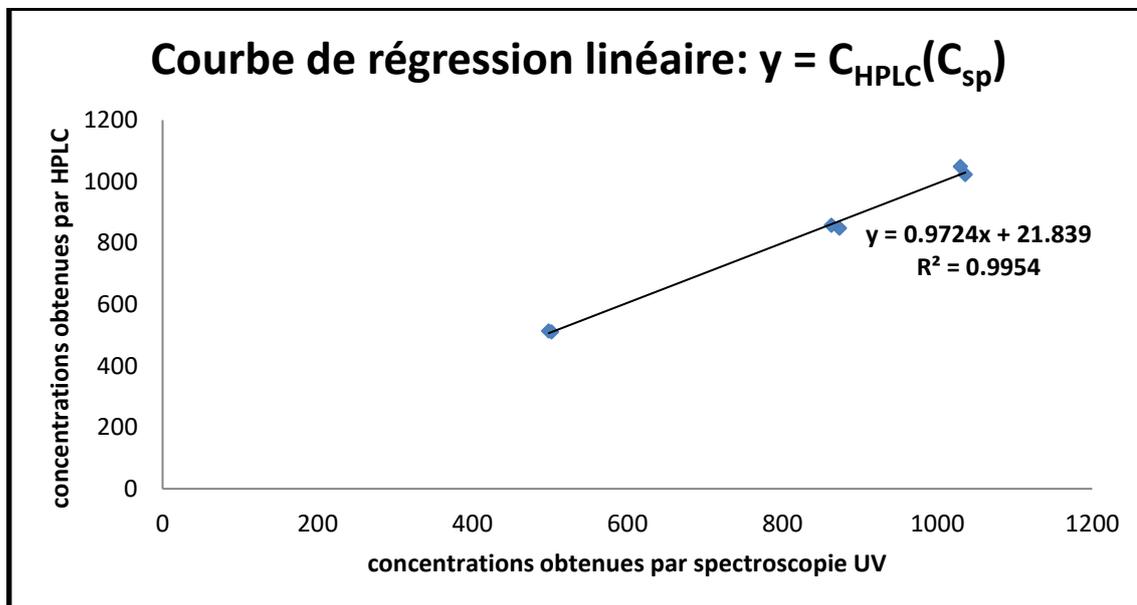


Figure 45 : Courbe de régression linéaire des concentrations obtenues par HPLC en fonction de celles obtenues par spectroscopie-UV

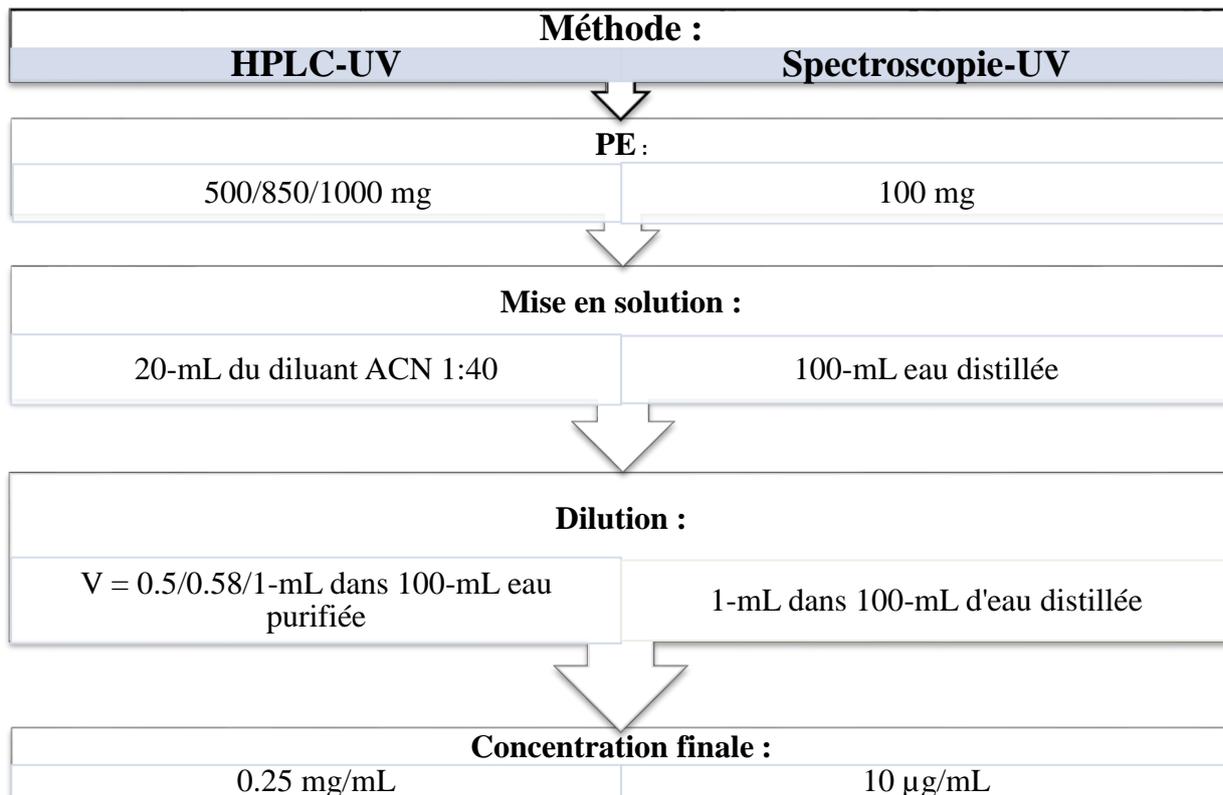
- **Commentaires :**

La courbe de régression linéaire $C_{\text{HPLC}}/C_{\text{spectroscopie UV}}$ est une droite qui passe par l'origine, elle témoigne une proportionnalité entre les mesures effectuées par chaque méthode.

Le coefficient de détermination (R^2) égal à **0.995** étant proche de l'unité il montre que les deux méthodes se valent et qu'elles sont fortement corrélées. La spectroscopie-UV et l'HPLC-UV donnent toutes les deux, des résultats identiques.

III-2- Comparaisons des modes opératoires de l'HPLC et de la spectroscopie-UV :

Pour de la réalisation des deux méthodes, les modes opératoires sont différents :



- Commentaires :

Dans la spectroscopie-UV on pèse l'équivalent de 100 mg de metformine hydrochloride, tandis que la prise d'essai en HPLC est plus grande. Pour solubiliser cette masse, on utilise l'eau distillée comme solvant en spectroscopie UV et de l'Acétonitrile 2,5% en l'HPLC. La dernière étape est la dilution d'un volume fixe en spectroscopie-UV, il est de 1-mL dilué au 1/100^{ème} dans de l'eau distillée, mais en HPLC il change selon le dosage pour arriver à une concentration finale de 0.25 mg/mL dans les solutions d'essai chromatographique, et 10 µg/mL à lire par le spectrophotomètre.

CONCLUSION

La metformine hydrochloride est une molécule largement utilisée dans le traitement du diabète type 2 (non insulino-dépendant). Ses propriétés physico-chimiques lui confèrent une certaine particularité dans son dosage : une bonne stabilité en solution aqueuse et une absorption au domaine de l'UV loin de celle de l'eau permettent son dosage par spectroscopie UV dont l'eau est le solvant, mais aussi son faible poids moléculaire et sa polarité font penser au dosage par HPLC dont différentes méthodes sont validées.

Entre spectroscopie UV et HPLC couplée à l'UV notre étude était menée dans le but de vérifier s'il s'agit de deux (02) méthodes différentes sur le plan qualitatif et quantitatif ou alors de deux méthodes où l'une peut substituer l'autre dans le contrôle-qualité de la metformine hydrochloride MP et PF. Après avoir fixé des paramètres de comparaison, différents PF ont été analysés par les deux méthodes.

Toutes les deux sont des méthodes quantitatives comparatives, nécessitant l'utilisation d'une substance de référence. Les deux méthodes diffèrent dans leurs principes mais le type de détection est le même.

La spectroscopie UV une méthode adaptée à l'analyse quantitative, et qui ne trouve son intérêt dans les analyses qualitatives que si on effectue un balayage consommant la lampe et on dispose d'un spectre de référence sur lequel repose l'identification du composé, mais on ne peut pas différencier deux composés chimiques dont la structure se ressemble et la longueur d'onde d'absorption est proche, elle permet de ce fait d'identifier la metformine hydrochloride seule sans ses impuretés. Le contraire de l'HPLC qui est une méthode de séparation sélective ayant les deux aspects qualitatif et quantitatif à la fois.

La préparation des échantillons pour HPLC passe par plusieurs étapes nécessitant plus de précautions à prendre que pour la spectroscopie, les étapes de préparations des échantillons à analyser sont les plus simples en ce qui concerne la spectroscopie. Ainsi, la durée de la préparation et de l'analyse sont plus importantes dans l'HPLC, et peuvent durer dans le temps, la chose qui écarte l'utilisation des dosages par HPLC quand on est limité par le facteur "temps".

Les résultats de notre étude attestent la présence d'une forte corrélation entre les deux méthodes sur le plan qualitatif et quantitatif. La précision, la répétabilité et la reproductibilité sont assurés avec les deux méthodes : le choix d'une méthode ou de l'autre ne dépend donc, que du type d'analyse à faire.

En terme de coût, une analyse spectroscopique utilisant un seul réactif qui est de l'eau distillée et un simple appareillage facile à manipuler, disponible dans chaque laboratoire de contrôle est toujours moins coûteuse qu'une analyse par HPLC, dont plusieurs réactifs chers, toxiques et nécessaires en grande quantité sont utilisés ainsi qu'un appareillage sophistiqué nécessitant un entretien particulier et un mode de manipulation qui n'est pas à la portée de tout le monde.

Ainsi, la spectroscopie trouve sa place dans les dosages de routine, elle est moins couteuse, limitée dans le temps et simple à réaliser, tandis que l'HPLC pousse loin l'analyse, elle est la mieux adaptée à l'identification et à la quantification des impuretés, ou aux dosages où la metformine hydrochloride se trouve en association avec d'autres PA dont une séparation est nécessaire avant de passer au dosage proprement dit.

L'étude a satisfait pleinement l'objectif fixé au début, cependant, elle reste toujours à compléter et à enrichir.

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES :

- 1- US Pharmacopeia 40, 2017
- 2- European Pharmacopeia 9^{ème} édition, 2017
- 3- British Pharmacopeia 2013
- 4- Japanese Pharmacopeia 15^{ème} édition, 2006
- 5- ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé). Mai 2013. Système Qualité Pharmaceutique (ICH Q10).
- 6- International Standard Organization (ISO), 15-12-2000. Norme Internationale : ISO 9000, Systèmes de management de la qualité, Principes essentiels et vocabulaire. Suisse : ISO 2000. 38p.
- 7- World Health Organization, 2017. WHO Model List of Essential Medicines 20th List.
- 8- World Health Organization .2017.WHO Model List of Essential Medicines for Children 6th List.

OUVRAGES :

- 9- AHUJA Satinder ; DONG W Michael (éditeurs), 2005. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC, Separation science and technology*, vol 6. UK : Elsevier INC. 658p.
- 10- AHUJA Satinder ; RASMUSSEN Henrik (éditeurs), 2007. *HPLC method development for pharmaceuticals, Separation science and technology*, vol 8. UK : Academic Press, Elsevier Inc.
- 11- AHUJA Satinder ; SCYPINSKI Stephen (éditeurs), 2001. *Handbook of modern pharmaceutical analysis : Separation science and technology*, vol 3. USA : Academic Press. 566p.
- 12- ALLO, Olivier ; BLANC, Pascale ; DALMASSO, Marie- ange, 2005. *Pharmacie galénique : BP, Porphyre*. Groupe liaison SA (2^{ème} édition), 132p.
- 13- ANSM, 2015. *Guide des bonnes pratiques de fabrication*. Décision du Directeur général de l'ANSM du 29 décembre 2015, modifiée par la décision du 30 décembre 2016.
- 14- BAIRD M Rosamund ; HODGES A Norman ; DENYER P Stephen (éditeurs), 2000. *Handbook of microbiological quality control : Pharmaceuticals and Medical Devices*. London : Taylor and Francis. 283p.
- 15- BERNIER S ; *et al*, 2008. *100 fiches pratiques : Sécurité des produits chimiques au laboratoire*, 2^{ème} édition. Paris : Dunod. 242p.
- 16- BIDLINGMEYER A Brian, 1992. *Practical HPLC methodology and applications*. USA : John Wiley and Sons. 452p.
- 17- BLOCK H John ; BEALE Jr M John, 2004. *Organic medicinal and pharmaceutical chemistry : Wilson and Gisvold's Textbook* ; 11^{ème} édition. Etats-Unis : Lippincott Williams and Wilkins. 991p.
- 18- BURGOT Gwenola, BURGOT Jean-louis, 2006. *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications*, 2^{ème} édition. Paris : Lavoisier.

- 19- BURMESTER Gerd-Rudiger ; PEZZUTO Antonio, 1998. *Atlas de poche d'immunologie : Bases, analyses biologiques et pathologies*. Stuttgart. Traduction : Flammarion Médecine-Science : Paris (2000). 283p.
- 20- BURNS A Donalds ; CIURCZAK W Emil (éd) ,2001. *Handbook of near-IR analysis*, 2ème édition. USA : Marcel Dekker. 814p.
- 21- CALOP Jean ; LIMAT Samuel ; FERNANDEZ Christine, 2008. *Pharmacie Clinique et thérapeutique*, 3^{ème} édition. Paris : Elsevier Masson.1352p.
- 22- CLARKE E.G.C, 1986. *CLARKE'S isolation and identification of drugs : in pharmaceuticals, body fluid and post-mortem material*, 2ème édition. London : The Pharmaceutical Press. 1684p.
- 23- COLIN f-Poole, 2003. *The essence of chromatographie*. Elsevier Science B.V. 925p.
- 24- CORRADINI Danilo, 2010. *Handbook of HPLC*. chromatographic science series, vol 101. Boca Raton, Floride.
- 25- CORRADINI Danilo ; PHILIPS M Terry (éditeurs), 2011. *Handbook of HPLC*, 2ème édition. Chromatographic science series vol 101. Boca Riton, Floride. CRC Press : Taylor and Francis Group. 695p.
- 26- CUQ Jean-Louis, 2007. *Chromatographie liquide*. Université Montpellier 2 sciences et techniques, 98p.
- 27- DEFERNE Jacques, 2010. *Introduction à la cristallographie*.
- 28- DIETER NEUE Uwe, 1997. *HPLC Columns : theory, technology and practise*.US : Wiley. 416p.
- 29- Direction Européenne de la Qualité des Médicaments et Soins de Santé, 2015. *Guide technique pour l'élaboration des monographies, Pharmacopée Européenne*, 7ème édition. Strasbourg, France : Conseil de l'Europe. 73p.
- 30- DONG W Michael, 2006. *Modern HPLC for practicing scientists*. New jersey : John Wiley and Sons. 286p.
- 31- DUKE A James, *et al*, 2002. *Handbook of medicinal herbs*, 2ème édition. USA : CRC Press LLC. 870p.
- 32- EVEN, Philippe ; DEBRE, Bernard. 2012. *Guide des 4000 médicaments utiles, inutiles ou dangereux : au service des malades et des patients*. Paris : le cherche midi,
- 33- FISHER Janos ; GANELLIN C Robin (éditeurs) 2010. *Analogue-based Drug Discovery II*. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. 538p.
- 34- FLANAGAN, R.J ; PERRETT, D ; WHELPTON, R, 2005. *Electrochemical detection in HPLC : Analysis of drugs and poisons*, RSC Chromatography Monographs. UK : RSC, Royal Society of Chemistry. 230p.
- 35- FONTENEAU, Jean-Marie ; KLUSIEWICZ, Philippe, 2008. *Travaux pratiques de préparations et de conditionnement des médicaments, Porphyre*. France : Wolters kluwer.251p.
- 36- GAZENGEL, Jean-Marie ; ORECCHIONI, Anne-Marie, 2013. *Le préparateur en pharmacie, Pharmacologie*. Paris :Lavoisier Tec et Doc.32p.
- 37- GEORGES WERMUTH Camille, 2008. *The Practice of Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd. (Third edition).982p.
- 38- GHOSH KUMAR Mantu, 1992. *HPLC methods on drug analysis*. Allemagne : Splinger-Verlag Berlin Heidelberg. 585p.
- 39- GOROG Sandor, 2000. *Identification and determination of impurities in drugs*. Elsevier Science BV : Amsterdam. 748p.

- 40- HAMON M ; PELLERIN F ; GUERNET M ; MAHUZIER G, 1990. *Chimie analytique Tome 3 : Méthodes spectrales et analyses organiques*, 2ème édition. Paris : Masson, 291p.
- 41- HANAI Toshihiko, 1999. *HPLC : A practical guide*, RSC Chromatography Monographs. UK : Royal Society of Chemistry. 134p.
- 42- HANSEN Steen ; PEDERSEN-BJERGAARD Stig ; RASMUSSEN KNUT, 2012. *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*. UK : John Wiley & Sons. 494p.
- 43- HARVEY David, 2000. *Modern analytical chemistry*. USA : McGraw-Hill Higher Education, 816p.
- 44- HENSEL Wolfgang, 2007. *350 Plantes médicinales* (Stuttgart). Paris: Delachaux et Nestlé SA. 255p.
- 45- HIBBERT D.Brynn, 2007. *Quality assurance for the analytical chemistry laboratory*. NEW YORK. Oxford University Press, 321p.
- 46- HORVATH csaba (éditeur), 1980. *HPLC advances and perspectives*. USA : Academic Press. 339p.
- 47- KAZAKEVICH Yuri ; LOBRUTTO Rosario (éditeurs), 2007. *HPLC for pharmaceutical scientists*. New Jersey : John Wiley & Sons. 1104p.
- 48- KROMIDAS Stavros, 2000. *Practical Problem Solving in HPLC*. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH. 178p.
- 49- KROMIDAS Stavros, 2005. *More practical problem solving in HPLC*. Weinheim : WILEY-VCH.294p.
- 50- KROMIDAS Stavros (éditeur), 2006. *HPLC, Made to measure : A practical handbook of optimization*. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 753p.
- 51- KUHLMANN Jochen ; PULS Walter (éditeurs) 1996. *Oral antidiabetics* . Berlin. Springer-Verlag 1ère édition. 733p.
- 52- LE HIR, Alain; CHAUMEIL, Jean-Claude; BROSSARD, Denis, 2009. *Pharmacie galénique : Les BPF des médicaments, Abrégés de pharmacie*, 9ème édition Elsevier Masson. 394p.
- 53- LULLMANN, Heinz ; MOHR, Klaus ; ZIEGLER, Albrecht, 1998. *Atlas de poche de pharmacologie*, 2ème édition. Paris : Médecine-Sciences Flammarion.387p.
- 54- LUNN George, 2005. *HPLC Methods for recently approved pharmaceuticals*. New Jersey : John Wiley and Sons. 717p.
- 55- LUNN George ; SCHMUFF R Norman, 1997. *HPLC methods for pharmaceutical analysis*. New York : John Wiley and Sons. 1609p.
- 56- MAHZIER G ; HAMON M ; FERRIER D ; PRGNOW P, 1999. *Chimie analytique, Tome 2 : méthodes de séparation, Abrégés de pharmacie*, 3ème édition. Elsevier Masson, 312p.
- 57- MASTAI Yitzhak (éditeur) 2015. *Advanced topics in crystallization: chapitre 6 : Role of crystallization in genesis of diverse crystal forms of antidiabetic agents*. INTECH. 134p-154p.
- 58- MATHIEU, Marie-José ; FONTENAU, Jean-Marie, 2008. *Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie, le porphyre*. Reuil-Malmaison : Wolters Kluwer. 1446p.
- 59- McMASTER C Marvin, 2007. *HPLC : A Practical user's guide*, 2ème édition. New Jersey : John Wiley and Sons. 238p.
- 60- MEYER R Veronika, 2013. *Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures*. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. 209p.
- 61- MIDDLEDITCH S Brian, 1989. *Analytical artifacts : GC, MS, HPLC, TLC and PC*. New York : Elsevier Science publishers. 1031p.

- 62- MISRA Prabhakar ; DUBENSKII A Mark (éd) 2002. *UV Spectroscopy and UV Lasers*. Marcel Dekker : Taylor and Francis.
- 63- MISTRY D B, 2009. *A handbook of spectroscopic Data chemistry : UV, IR, CNMR, SM*. Inde : Oxford. 242p.
- 64- MITRA Somenath (éditeur) 2003. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Hoboken, New Jersey : John Wiley and Sons, 474p.
- 65- MUELLER Michael, 2002. *Fundamentals of Quantum Chemistry : Molecular Spectroscopy and Modern Electronic Structure Computations*. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers. 265p.
- 66- NEAL Michael, 1999 ; *Pharmacologie médicale en bref* ; 2ème édition française traduction de la 4ème édition anglaise. 107p.
- 67- NUNNALLY K Brian ; McCONNEL S John, 2007. *Six Sigma in the pharmaceutical industry : Understanding, reducing and controlling variation in pharmaceuticals and biologicals*. Boca Raton, Floride : CRC Press, Taylor and Francis Group. 195p.
- 68- OHANNESIAN Lena ; STREETER J Antony, 2002. *Handbook of Pharmaceutical Analysis*. USA : Marcel Dekker.
- 69- OMS, 2005. *Manuel de sécurité biologique en Laboratoire*. Genève : 3^{ème} édition. 234p.
- 70- OWEN Tony, 1996. *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*, Allemagne: Hewlett-Packard Company. 142p.
- 71- PARKER, N James ; PARKER, Philip M, (éditeurs), 2004. *Metformin : A medical dictionary, bibliography, And annotated research guide to internet references*. USA : ICON Group International, Inc, 297p.
- 72- PARRIOT Donald (éditeur) 1993. *A Practical guide to HPLC detection*. California : Academic Press INC. 293p.
- 73- PEDERSEN Ole, 2006. *Pharmaceutical Chemical Analysis: Methods for Identification and Limit Tests*. Boca raton, Florida : Taylor and Francis group LLC. 150p.
- 74- PERKAMPUS Heinz-Helmut, traduit par GRINTER H Charlotte ; THRELFALL T L, 1992. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*. Allemagne : Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 244p.
- 75- PERLEMUTER Gabriel ; PERLEMUTER Léon, 2010. *Guide de thérapeutique*. Elsevier Masson S.A.S (6e édition). 2246p.
- 76- PIERRE Valdiguié ,coordinateur. *Biochimie Clinique*, 2ème édition. Editions Médicales Internationales : France.
- 77- QUEVAUVILLIERS, Jacques ; SOMOGYI, Alexandre; FINGERHUT, Abe, 2009. *Dictionnaire Médical*. Elsevier Masson S.A.S (6èmeédition). 1561p.
- 78- ROUESSAC, Francis ; ROUESSAC, Annick avec la collaboration de CRUCHE, Daniel, 2004. *Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 6^{ème} édition Paris : Dunod, 481p.
- 79- SADEK C Paul, 2002. *The HPLC Solvent guide*, 2nd édition. New York : John Wiley and Sons. 643p.
- 80- Sanofi-aventis Canada inc. August 22, 2017. *Glucophage: Metformin hydrochloride tablets Manufacturer's standard*, 500 mg, 850 mg. Canada. 33p.
- 81- SARKER D Satyajit ; NAHAR Lutfun, 2007. *Chemistry for Pharmacy Students : General, Organic and Natural Product Chemistry*. Angleterre : John Wiley & Sons. 383p.
- 82- SARKER K Dipak, 2008 ; *Quality systems and controls for pharmaceuticals*. UK. John Wiley and Sons. 182p.

- 83-** SKOOG Douglas A. ; WEST Donald M. ; HOLLER F.James ; CROUCH Stanley R. 2004. *Fundamentals of analytical chemistry*. 8^{ème} édition. Canad : Books Cole, Thomson. 1179p.
- 84-** SNYDER R Lioyd ; KIRKLAND J Joseph ; GLAJCH L Joseph, 1997. *Practical HPLC method development*, 2nd edition. USA : John Wiley and sons. 765p.
- 85-** SWADESH K Joel (éditeur), 2001. *HPLC practical and industrial applications*, 2^{ème} édition, Analytical Chemistry Series. US : CRC Press.
- 86-** VAUBOURDOLLE, Michel, 2007. *Médicaments*. Eugène: Wolters Kluwer SA (3^{ème}édition) .884p.
- 87-** WANG G Perry (éditeur) 2009. *High-throughput analysis in the pharmaceutical industry*. Boca raton, Floride : Taylor and Francis Group : CRC Press. 413p.
- 88-** WELLING A Donald, 2006. *A Practical Handbook of preparative HPLC*. UK : Elsevier. 180p.
- 89-** WERMUTH, Georges.Camille.2008. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3^{ème} édition. Elsevier : London Ltd..982p.
- 90-** WESTON Andrea ; BROWN R Phyllis, 1997. *HPLC and CE : Principles and practise*. USA : W.B.Saunders Company; Academic Press. 280p.
- 91-** WILLING H Sidney, 2001. *Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical : A Plan far Total Quality Control from Manufacturer to Consomer*, 4^{ème} édition. USA : Marcel Dekker.

ARTICLES :

- 92-** ADHIKARI L, *et al*, 2012. *Development and validation of UV-Visible spectrophotometric method for simultaneous determination of Pioglitazone Hydrochloride, Metformin Hydrochloride and Glipizide in its Bulk and pharmaceutical dosage form (Tablet)*. International Journal of ChemTech Research, Vol. 4, N° 2, p625-630.
- 93-** AKRERUZZAMAN Md, *et al*, 2012. *Development and Validation of a Simple RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Metformin Hydrochloride and Rosiglitazone in Pharmaceutical Dosage Forms*. Dhaka Univ. J. Pharm. Sci. 11(2). p157-163.
- 94-** Arayne Mohammed Saeed, SULTANA Najma, ZUBERI Hashim, 2006. *Development and validation of RP-HPLC method for analysis of metformin*. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, Vol.19, N° 3, p231-235.
- 95-** BAILEY J, C ; MYNETT K, J ; PAGE, T, 1994. *Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization*. British journal of Pharmacology, V.112, p. 671-675.
- 96-** BAILEY, *et al*, 2007. *Metformin : The Gold Standard*. Merck, p.3-9.
- 97-** BAILEY, J.Clifford ; Day, Caroline, 2004. *Metformin : its botanical background*. *Practical Diabetes*, V.21, N° 3, p.115-117.
- 98-** BALSELLS Montserrat, 2015. *Glibenclamide, metformin, and insulin for the treatment of gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis*. RESEARCH, p01-12.
- 99-** BATS Marie-Lise , *et al*, 2009. *Acidose lactique et interférence analytique lors du dosage de l'éthylène glycol selon une méthode colorimétrique : à propos d'un cas*, *Annales de Toxicologie Analytiques*. Société Française de Toxicologie Analytique. p119-123.
- 100-** BIDLINGMEYER Brian, *et al*, 2005. *HPLC Column Classification*, Pharmacopeial Forum Vol. 31(2). The United States Pharmacopeial Convention, Inc. P637-645.

- 101- BOUAISSI Wafa, ABIDI Mbarek et BEN HAMIDA Najib , 2013. *Optimisation et validation d'une methode de dosage par hplc/dad d'un antihypertenseur le zofenopril*, Journal de la Société Chimique de Tunisie 15. p39-50.
- 102- BRIDGES R Hannah, *et al*, 2014. *Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria* , Biochem. UK. J. p475–487.
- 103- CHHETRI Himal Paudel, THAPA Panna et SCHEPDAEL Ann Van, 2014. *Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation*, Saudi Pharmaceutical Journal, 22. Elsevier B.V. p483–487.
- 104- CLIFFORD J Bailey, 2017. *Metformin: historical overview* , Diabetologia 60. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p1566–1576.
- 105- CLIFFORD, J, 1996. *Metformin*. The new england journal of medicine, V.334, N°09, p.574-579.
- 106- DEVEAUX Marc, 2002. Note de laboratoire : *Dosage ultra-rapide de la metformine plasmatique par Chromatographie liquide d'interaction hydrophile*, Annales de Toxicologie Analytique, vol. XIV, n° 2. France.p125-128.
- 107- ELANGO P, RAMESH, SHANMUGANATHAN S, 2014. *A Comparative analysis of commercial Metformin tablets*. Indian Journal of Clinical Practice, Vol. 24, N° 8, p 778-783.
- 108- ELMORSY Khaled, *et al*, 2012. *Miniaturized ionophore-based potentiometric sensors for the flow-injection determination of Metformin in pharmaceutical formulations and biological fluids*. The Royal Society of Chemistry : Analyst, Vol. 137, p5680–5687.
- 109- ENGELHARDT Heinz, 2004. *One century of liquid chromatography From Tswett's columns to modern high speed and high performance separations*, Journal of chromatography. ELSEVIER : Germany. p03–06.
- 110- FORETZ Marc, *et al*, 2014. *Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies*, Cell Metabolism Review. Elsevier Inc. P953-966.
- 111- FRIEDRICH Christian , *et al*, 2014. *Bioequivalence of Glucophage® (Metformin) Tablets from Europe and the United States Tested in ealthy Volunteers*, Volume 6(2). Jornal of Bioequivalence & Bioavailability. p61-66.
- 112- GARTLAND Joanne, 2011. *Analysis of Melamine and Metformin Hydrochloride by HPLC-UV*, Thermo Fisher Scientific. UK. P
- 113- GEORGIȚĂ Cristina, *et al*, 2010. *Comparison of a LC/MS method with a LC/UV method for the determination of metformin in plasma samples*. FARMACIA, Vol.58, N°1, p158-169.
- 114- GOETZ, P ; LE JEUNE, R, 2008. *Galega officinalis*. Phytothérapie, V.6, p.39–41.
- 115- GONZALEZ A. Gustavo, HERRADOR M. Angeles, 2007. *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, No. 3. Elsevier Ltd.p227-238.
- 116- GRAPPIN R, 1976. *Guide pour l'evaluation des méthodes d'analyses de routine*, Pologny. HAL. p608-621.
- 117- GUNASEKARAN S, *et al*, 2006. *Vibrational spectra and thermodynamic analysis of metformin*. Indian journal of pure and applied physics, vol. 44, p499-500.
- 118- HARDIE D Grahame, 2014. *AMPK—Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways*, Cell Metabolism 20. Elsevier Inc : UK. P939-952.
- 119- HASSAN S.M Saad, *et al*, 1999. *Determination of metformin in pharmaceutical preparations using potentiometry, spectrofluorimetry and UV-visible spectrophotometry*. Analytica Chimica Acta, Vol. 378, p299-311.
- 120- HOWELL J Jessica, *et all*, 2017. *Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex*, Cell metabolism. Elsevier Inc : USA. p01–09.

- 121- ISERIN Paul, 2001. *Larousse, Encyclopédie des plantes médicinales* : identification, préparations, soins. Larousse : Hong kong.
- 122- Jagadeesh Babu Nanubolu, *et al*, 2013. *Polymorphism in metformin embonate salt – recurrence of dimeric and tetrameric guanidinium–carboxylate synthons*. RSC Publishing, CrystEngComm. p4448–4464.
- 123- JAGDALE, SC, *et al* . *Preparation and characterization of metformin hydrochloride* . Compritol 888 ATO Solid Dispersion. Journal of Young Pharmacists, V.03, N°03, p.197-204.
- 124- JONES D Michael, WILLIAM Ben, 2013. *A UPLC method for analysis of Metformin and related substances by hydrophilic interaction chromatography (HILIC)*. Waters «The Science of What’s Possible ». p01-07.
- 125- KUMAR DE Asit , KUMAR DEY Ayan *et BISWAS* Angshuman, 2012. *Simultaneous estimation of metformin hydrochloride and glibenclamide by rphplc method from combined tablet dosage form*, International journal of Science Inventions Today : IJSIT, Volume 1 issue 2. p98-105.
- 126- LIANG, Xiaomin, *et al*. *Metformin is a substrate and inhibitor of the Human Thiamine Transporter, THTR-2 (SLC19A3)*. Molecular pharmaceutics article.
- 127- LIU Guojing, *et al*, 2016. *The effects of rabeprazole on metformin pharmacokinetics and pharmacodynamics in Chinese healthy volunteers*, Journal of Pharmacological Sciences 132. p244-248.
- 128- MADHUKAR A, *et al*, 2011. *Simple and sensitive analytical method development and validation of Metformin hydrochloride by RP-HPLC*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol. 3, N° 3, p117-120.
- 129- MARIC Andreja, 2010. *METFORMIN – More than gold standard in the treatment of type 2 diabetes mellitus*, Diabetologia Croatica 39-3. p95-104.
- 130- MCCREIGHT J, Laura ; BAILEY J, Clifford ; Pearson R, Ewan, 2016. *Metformin and the gastrointestinal tract*. Diabetologia, V.59, p.426–435.
- 131- MESTROVIC Tomislav , 2015. *Metformin Chemistry*. New Medical, aspx.
- 132- MONDRAGON Maria Lourdes Garcia, *et al*, 2015. *Metformin-orlistat compositions*, United States : Patent Application Publication. p01-04.
- 133- MUBEEN G, NOOR khalikha, 2009. *Spectrophotometric Method for Analysis of Metformin Hydrochloride*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, p100-101.
- 134- NAFADY.M Mohamed ; M ATTALLA Khaleid ; SAYED. A Mohamed, 2014. *Formulation and evaluation of extended release metformin hydrochloride beads*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol. 6, N° 2, p433-441.
- 135- ONAL Armagan, 2009. *Spectrophotometric and HPLC determinations of anti-diabetic drugs, rosiglitazone maleate and metformin hydrochloride, in pure form and in pharmaceutical preparations*. European Journal of Medicinal Chemistry 44. Turkey : ELSEVIER . p4998–5005.
- 136- PALIT, P ; FURMAN, B. L ; GRAY, A,I, 1999. *Novel weight-reducing activity of Galega officinalis in mice*. Journal pharm.pharmacol, V.51, p.1313-1319. 116 (2008) 21–26
- 137- PORWAL K Pawan, TALELE S Gokul, 2017. *Development of validated HPLC-UV method for simultaneous determination of Metformin, Amlodipine, Glibenclamide and Atorvastatin in human plasma and application to protein binding studies*. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University, Vol. 55. P129–139.
- 138- PRAVEEN KUMAR A, 2013. *Analytical method development and validation of Alogliptin and Metformin Hydrochloride tablet dosage form by RP-HPLC method*. International Bulletin of Drug Research, Vol. 3, N° 5, p58-68.
- 139- RANETTI Maria-Cristina, *et al*, 2009. *Validation of a HPLC method for the*

- simultaneous analysis of metformin and gliclazide in human plasma*. FARMACIA, Vol. 57, N° 6, p728-735.
- 140- RANGEL-VAZQUEZ Norma–Aurea, DELGADILLO-ARMENDARIZ Nancy-Liliana, SALAS-AGUILAR Claudia-Lizeth, 2015. *Analysis of Metformin applied different tools computational for determine all the characteristics of drug*. Journal of Nanomedicine Research, Vol. 2, N° 2, p01-04.
- 141- RASEKH, R.Hamid R, et al, 2008. *Acute and subchronic oral toxicity of Galega officinalis in rats*. Journal of Ethnopharmacology, V.116, p.21-26.
- 142- REUTER, G.1962. On guanidine metabolism in *Galega officinalis*. Phytochemistry, V.1, p.63-65.
- 143- SHALMAHI Anvar, 2008. *New Route to Metformin Hydrochloride (dimethylimidodicarbonimidic diamide hydrochloride) Synthesis*, Molbank, M564.
- 144- SHEELA N.R ; MUTHU S ; SAMPATH Krishnan S, 2010. *FTIR, FT Raman and UV-Visible spectroscopic analysis on Metformin Hydrochloride*. Asian Journal of Chemistry, Vol. 22, N° 7, p5049-5056.
- 145- SHUKLA Rajesh, et al, 2012. *Chromophore : An Utility in UV Spectrophotometer*, Inventi Rapid: Pharm Ana & Qual Assur Vol. 2012, Issue 3. Research Gate.p01-04.
- 146- Shuyan Gu, 2015. *Cost-Minimization Analysis of Metformin and Acarbose in Treatment of Type 2 Diabetes*, VALUE IN HEALTH REGIONAL ISSUES 6C, Science Direct. Elsevier. p84 – 88.
- 147- SIDDIQUI Farhan Ahmed, et al, 2013. *Analysis of Metformin, Glimepiride and Pioglitazone in human serum and its application to pharmacokinetics*. The Royal Society of Chemistry : Analytical Methods, Vol. 5. p5096–5104.
- 148- SIDDIQUI Farhan Ahmed, et al, 2017. *Concurrent determination of Metformin and some ACE inhibitors : Its application to pharmacokinetics*. Arabian Journal of Chemistry, Vol. 10, p2979–2987.
- 149- TROUILLAS Patrick, et al, 2014. *Mechanism of one-electron oxidation of metformin in aqueous solution*, the Owner Societies Journal. RSC Publishing.
- 150- UÇAKTURK Ebru, 2013. *The development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of metformin in human plasma*. Analytical Methods, Vol. 5, p4723–4730.
- 151- UMAPATHI P ; AYYAPPAN J and QUINE S Darlin, 2012. *Quantitative Determination of Metformin Hydrochloride in Tablet Formulation Containing Croscarmellose Sodium as Disintegrant by HPLC and UV Spectrophotometry*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research. p107-116.
- 152- UMAPATHI P, 2012. *Quantitative Determination of Metformin Hydrochloride in Tablet Formulation Containing Croscarmellose Sodium as Disintegrant by HPLC and UV Spectrophotometry*. International Journal of analysis, N°4. 9p.
- 153- VIOLLET Benoit ; FORETZ Marc ; ANDREELLI , Fabrizio, 2014. *Metformine : le point sur les mécanismes d'action*.HAL. P16.
- 154- WERNER, Emil Alphonse ; BELLJAMEBESL L, 1922. *The Preparation of Methylguanidine, and of bb-Dimethylguanidine by the Interaction of Dicyanodiamide, and Methylammonium and Dimethylammonium Chlorides Respectively*, p.1790-1794.

AUTRES :

- 155-** AFSSAPS (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé), Direction de l'Évaluation des Médicaments et des Produits Biologiques, Mai 2009. Rapport public d'évaluation de METFORMINE VENIPHARM 500 mg, comprimé pelliculé. 04p.
- 156-** De Beer M, 2015. *Simultaneous analysis of Metformin and Gliclazide as an application in a broadened elution window by serially coupled RP-LC and HILIC*. AAPS Annual Meeting and Exposition. October p25-29.
- 157-** European Medicines Agency, Rev 06-2011. *Saxagliptin / metformin : Komboglyze, comprimés 2.5/850 et 2.5/1000*. Procedure No. EMEA/H/C/002059. 77p.
- 158-** European Medicines Agency, 2011. *Assessment report for Bydureon : exenatide^{ROW}, LP. 2 mg*. 67p.
- 159-** FAULKNER W, *et al*, 2011. *Analysis of metformin on a perfluorophenyl stationary phase by HPLC/UV*. Thermo Fisher Scientific. 03p.
- 160-** HAS : Haute Autorité de Santé, Commission de la Transparence, 21-07-2010. *Avis : Examen du dossier des spécialités inscrites pour une durée de 5 ans à compter du 30 août 2005 (JO du 3 août 2007), GLUCOPHAGE 500, 850 et 1000 mg, comprimés pelliculés*. Laboratoire Merck Serono. 03p.
- 161-** Janssen Pharmaceutical Companies, 2014 révisé en 07-2017. *Medication Guide : INVOKAMET, canagliflozin and metformin hydrochloride Tablets, 50/500, 50/1000, 150/500 et 150/1000 mg*. Reference ID: 4129180. Titusville. 55p.
- 162-** JENTADUETO, Boehringer Ingelheim (Canada) : Date de préparation 22 décembre 2016. MONOGRAPHIE DE PRODUIT : linagliptine/chlorhydrate de metformine : JENTADUETO, Comprimés de 2,5 mg/500 mg, 2,5 mg/850 mg et 2,5 mg/1000 mg. 62p.
- 163-** Merck Sharp & Dohme Corp, 2012 révisé en 02-2014. *Medication Guide : JANUMET® XR, sitagliptin and metformin hydrochloride extended-release Tablets : 50 mg/500 mg et 50 mg/1000 mg*. Approuvé par FDA. Merck Sharp & Dohme Corp, Merck & Co, Inc Whitehouse Station : USA. Reference ID: 3453495. 05p.
- 164-** REPORTS : DECEMBER 2006. *The developing role of metformin (Glucophage®) in the treatment of type 2 diabetes*, REPORTS AND KEY OPINION LEADER COMMENTS ON NEW INTERNATIONAL GUIDELINES RECOMMENDING METFORMIN AT DIAGNOSIS Official Journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease, VOLUME 3 SUPPLEMENT 3 / Diabetes Care 2006;29:1963-72
- 165-** Sandoz Canada Inc, janvier 2016. *Sandoz Metfomin^{FC} : 500 mg et 850 mg, comprimés*. Canada . 36p.

SITES INTERNET :

- 166-** Actualité de la chimie, Paris, 2002. Techniques expérimentales : Méthodes chromatographiques. Consulté le 25-03-2018. <http://sciences-en-ligne.com/>
- 167-** Dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie, Biopharmacie : Système de classification biopharmaceutique (BCS), Mars 2017. Consulté le 18-06-2018. <http://dictionnaire.acadpharm.org/>
- 168-** Drugs.com, Know more be sure, révisé en Avril 24, 2017. Metformin Hydrochloride. Consulté le 02-01-2018. <https://www.drugs.com/>
- 169-** Fédération Française des Diabétiques (FFD). LE DIABÈTE DANS LE MONDE, Diabetes Atlas IDF 8e Edition 2017. Consulté en Avril, reconsulté le 20-06-2018.

- <https://www.federationdesdiabetiques.org/>
- 170- HoneyWell, Solvents Reagents and Aerosols, : <https://www.lab-honeywell.com/>
- 171- ICH, International Conference of Harmonisation : <http://www.ich.org/>
- 172- ISO, International standard Organization : <https://www.iso.org/>
- 173- MSRH, Ministère de Santé Publique et de la Réforme Hospitalière : www.sante.gov.dz/
- 174- PanReact AppliChem ITW Reagents : <https://www.itwreagents.com/>
- 175- Pharma Research Library, Online Journals, 2013. Development of a new UV/Visible Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneous estimation of Metformin and Sitagliptin. Consulté le 02-01-2018. <https://www.pharmaresearchlibrary.com/>
- 176- PubChem Metformin Hydrochloride, Compound Summary for CID 14219. Consulté le 22-02-2018. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 177- ScienceDirect : <https://www.sciencedirect.com/>
- 178- Sigma-Aldrich, Products : <https://www.sigmaaldrich.com/>
- 179- SPRINGER, 2017 : Chemistry and Structure-Activity Relationships of Biguanides, Part of the Handbook of Experimental Pharmacology (HEP, volume 119) de PRUGNARD M E.Noel (1996). Consulté le 27-02-2018. Springer International Publishing AG : Part of Springer Nature. Online ISBN 978-3-662-09127-2. SpringerLink <https://link.springer.com/>
- 180- Statistica, The Statistics Portal, Statistics and Studies from more than 22,500 Sources, 2018. Top ten diabetes drugs in the U.S. by prescriptions dispensed 2011-2012. consulté le 27-04-2018. <https://www.statista.com/>
- 181- Thériaque, banque de donnée sur les médicaments Thériaque, Consulté le 28-01-2018 : <http://www.theriaque.org/>
- 182- Virtuel Fiel-Guide to UK Biodiversity, 07-2000. Consulté le 27-02-2018. Berkshine , UK. <http://www.bioimages.org.uk/>
- 183- Vidal, dictionnaire en ligne : <http://www.vidalfrance.com/>, dernière consultation : 15-06-2018
- 184- VWR, Produits chimiques : <https://fr.vwr.com/>

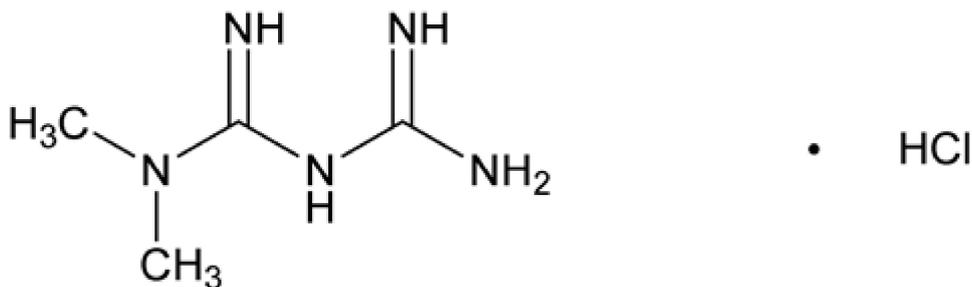
ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

- **ANNEXE I :** USP Metformine Hydrochloride MP
- **ANNEXE II :** USP Metformine Hydrochloride PF
- **ANNEXE III :** USP Glyburide and Metformine Hydrochloride Tablets
- **ANNEXE IV :** USP Metformin Hydrochloride Extended-Release Tablets
- **ANNEXE V :** USP allowed changes
- **ANNEXE VI :** COA de l'Acétonitrile 01
- **ANNEXE VII :** COA de l'Acétonitrile 02
- **ANNEXE VIII :** COA de l'Acide orthophosphorique 01
- **ANNEXE IX :** COA de l'Acide orthophosphorique 02
- **ANNEXE X :** COA de Chlorure de sodium NaCl
- **ANNEXE XI :** COA de l'heptanesulfonate de sodium monohydraté
- **ANNEXE XI :** COA de Metformine Hydrochloride, Laboratoire FLUKA
- **ANNEXE XII** Résultats des balayages : Les spectres d'absorption des MP et PF
- **ANNEXE XIII :** Résultats des deux HPLC

Metformin Hydrochloride

(met for' min hye'' droe klor' ide).

 $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ 165.62Imidodicarbonimidic diamide, *N,N*-dimethyl-, monohydrochloride;

1,1-Dimethylbiguanide monohydrochloride [1115-70-4]; UNII: 786Z46389E.

DEFINITION

Metformin Hydrochloride contains NLT 98.5% and NMT 101.0% of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$), calculated on the dried basis.

IDENTIFICATION

- **A. [INFRARED ABSORPTION \(197K\)](#)**
- **B. [IDENTIFICATION TESTS—GENERAL, Chloride \(191\)](#)**: Meets the requirements

ASSAY• **PROCEDURE****Sample:** 60 mg of Metformin Hydrochloride**Analysis**

[NOTE—To avoid overheating of the reaction medium, mix thoroughly throughout the titration, and stop the titration immediately after the endpoint has been reached.]

Dissolve the *Sample* in 4 mL of anhydrous formic acid, and add 50 mL of acetic anhydride. Titrate with 0.1 N perchloric acid VS, determining the endpoint potentiometrically. Perform a blank determination, and make any necessary correction (see [Titrimetry \(541\)](#)). Each mL of 0.1 N perchloric acid is equivalent to 8.28 mg of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$).

Acceptance criteria: 98.5%–101.0% on the dried basis**IMPURITIES**

- **[RESIDUE ON IGNITION \(281\)](#)**: NMT 0.1%

Delete the following:

- **[HEAVY METALS, Method 1 \(231\)](#)**: NMT 10 ppm • (Official 1-Jan-2018)

• **ORGANIC IMPURITIES****Mobile phase:** 17 g/L of monobasic ammonium phosphate in water, adjusted with phosphoric acid to a pH of 3.0**System suitability stock solution:** 0.25 mg/mL of metformin hydrochloride and 0.1 mg/mL of melamine in water**System suitability solution:** Transfer 1.0 mL of the *System suitability stock solution* to a 50-mL volumetric flask, and dilute with *Mobile phase* to volume.**Standard stock solution:** 0.2 mg/mL of USP Metformin Related Compound A RS in water**Standard solution:** 0.001 mg/mL of USP Metformin Related Compound A RS in *Mobile phase* from the *Standard stock solution*

Sample solution: 5 mg/mL of Metformin Hydrochloride in *Mobile phase*

Diluted sample solution: 0.005 mg/mL of Metformin Hydrochloride in *Mobile phase* from the *Sample solution*

Chromatographic system

(See [Chromatography \(621\)](#), [System Suitability](#).)

Mode: LC

Detector: UV 218 nm

Column: 4.6-mm × 25-cm; packing L9

Flow rate: 1.0–1.7 mL/min

Run time: NLT twice the retention time of metformin

Injection volume: 20 µL

System suitability

Sample: *System suitability solution*

Suitability requirements

Resolution: NLT 10 between melamine and metformin

Analysis

Samples: *Standard solution*, *Sample solution*, and *Diluted sample solution*

Calculate the percentage of metformin related compound A in the portion of Metformin Hydrochloride taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U = peak response of metformin related compound A from the *Sample solution*

r_S = peak response of metformin related compound A from the *Standard solution*

C_S = concentration of USP Metformin Related Compound A RS in the *Standard solution* (mg/mL)

C_U = concentration of Metformin Hydrochloride in the *Sample solution* (mg/mL)

Calculate the percentage of any other impurity in the portion of Metformin Hydrochloride taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times D \times 100$$

r_U = peak response of an individual impurity from the *Sample solution*

r_S = peak response of metformin from the *Diluted sample solution*

D = dilution factor for the preparation of the *Diluted sample solution*, 0.001

Acceptance criteria

Individual impurities: NMT 0.02% for metformin related compound A; NMT 0.1% for any other impurity

Total impurities: NMT 0.5%

SPECIFIC TESTS

- [LOSS ON DRYING \(731\)](#)

Analysis: Dry a sample at 105° for 5 h.

Acceptance criteria: NMT 0.5%

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in well-closed containers. Store at room temperature.

- [USP REFERENCE STANDARDS \(11\)](#)

USP Metformin Hydrochloride RS 

USP Metformin Related Compound A RS 

1-Cyanoguanidine.

C₂H₄N₄ 84.08**Auxiliary Information**— Please [check for your question in the FAQs](#) before contacting USP.

Topic/Question	Contact	Expert Committee
Monograph	Elena Gonikberg, Ph.D. Director - Chemical Medicines (301) 816-8251	(CHM32015) Chemical Medicines Monographs 3
<197>	Edmond Biba, Ph.D. Scientific Liaison-General Chapters (301) 230-3270	(GCCA2015) General Chapters-Chemical Analysis 2015
<191>	Antonio Hernandez-Cardoso, M.Sc. Senior Scientific Liaison (301) 816-8308	(GCCA2015) General Chapters-Chemical Analysis 2015
<281>	Antonio Hernandez-Cardoso, M.Sc. Senior Scientific Liaison (301) 816-8308	(GCPA2015) General Chapters-Physical Analysis 2015
<231>	Kahkashan Zaidi, Ph.D. Senior Scientific Liaison (301) 816-8269	(GCCA2015) General Chapters-Chemical Analysis 2015
<731>	Antonio Hernandez-Cardoso, M.Sc. Senior Scientific Liaison (301) 816-8308	(GCPA2015) General Chapters-Physical Analysis 2015
Reference Standards	RS Technical Services 1-301-816-8129 rstech@usp.org	

USP40–NF35 Page 5047

Previously Appeared In:*Pharmacopeial Forum*: Volume No. 40(4)

Metformin Hydrochloride Tablets

DEFINITION

Metformin Hydrochloride Tablets contain NLT 95.0% and NMT 105.0% of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$).

IDENTIFICATION

- **A. [INFRARED ABSORPTION \(197K\)](#)**

Sample: Transfer an amount of powdered Tablets, equivalent to 20 mg of metformin hydrochloride, to a suitable flask. Add 20 mL of dehydrated alcohol, and shake. Filter, evaporate the filtrate on a water bath to dryness, and dry the residue at 105° for 2 h.

Acceptance criteria: Meet the requirements

- **B.**

Solution A: Dissolve 1 g of 1-naphthol in a solution containing 6 g of sodium hydroxide and 16 g of anhydrous sodium carbonate in 100 mL of water.

Sample solution: Triturate an amount of powdered Tablets, equivalent of 50 mg of metformin hydrochloride, with 10 mL of water, filter, and use the filtrate.

Analysis: To 5 mL of the *Sample solution* add 1.5 mL of 5 N sodium hydroxide solution and 1 mL of *Solution A*. Add 0.5 mL of sodium hypochlorite TS, dropwise, and with shaking.

Acceptance criteria: An orange-red color is produced that darkens on standing.

- **C. [IDENTIFICATION TESTS—GENERAL, Chloride \(191\)](#)**

Sample solution: Prepare as directed for the *Sample solution* in *Identification test B*.

Acceptance criteria: Meet the requirements

ASSAY

- **PROCEDURE**

Standard solution: 10 µg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in water

Sample solution: Weigh and finely powder NLT 20 Tablets. Transfer the amount of powder, equivalent to 100 mg of metformin hydrochloride, to a 100-mL volumetric flask. Add 70 mL of water, shake by mechanical means for 15 min, dilute with water to volume, and filter, discarding the first 20 mL of the filtrate. Dilute 10.0 mL of the filtrate with water to 100.0 mL, and dilute 10.0 mL of the resulting solution with water to 100.0 mL. The nominal concentration of this solution is 10 µg/mL.

Instrumental conditions

(See [Ultraviolet-Visible Spectroscopy \(857\)](#).)

Mode: UV

Analytical wavelength: Wavelength of maximum absorbance at about 232 nm

Cell: 1 cm

Blank: Water

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) in the portion of the Tablets taken:

$$\text{Result} = (A_U/A_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of USP Metformin Hydrochloride RS in the *Standard solution* (µg/mL)

C_U = nominal concentration of metformin hydrochloride in the *Sample solution* ($\mu\text{g/mL}$)

Acceptance criteria: 95.0%–105.0%

PERFORMANCE TESTS

• DISSOLUTION (711).

Test 1

Medium: pH 6.8 phosphate buffer; 1000 mL

Apparatus 1: 100 rpm

Time: 45 min

Standard solution: USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable filter.

Instrumental conditions

(See [Ultraviolet-Visible Spectroscopy \(857\)](#).)

Mode: UV

Analytical wavelength: Wavelength of maximum absorbance at about 233 nm

Analysis: Determine the amount of metformin hydrochloride ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_5\cdot\text{HCl}$) dissolved by using UV absorption of filtered portions of the *Sample solution*, suitably diluted with *Medium*, if necessary, in comparison with the *Standard solution*.

Tolerances: NLT 70% (Q) of the labeled amount of metformin hydrochloride ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_5\cdot\text{HCl}$) is dissolved.

Test 2: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 2*.

For products labeled to contain 500 mg of metformin hydrochloride

Medium: pH 6.8 phosphate buffer; 1000 mL

Apparatus 2: 50 rpm

Time: 30 min

Standard solution, Sample solution, Instrumental conditions, and Analysis: Proceed as directed in *Test 1*.

Tolerances: NLT 80% (Q) of the labeled amount of metformin hydrochloride ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_5\cdot\text{HCl}$) is dissolved.

For products labeled to contain 850 or 1000 mg of metformin hydrochloride

Medium: pH 6.8 phosphate buffer; 1000 mL

Apparatus 2: 75 rpm

Time: 30 min

Standard solution, Sample solution, Instrumental conditions, and Analysis: Proceed as directed in *Test 1*.

Tolerances: NLT 75% (Q) of the labeled amount of metformin hydrochloride ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_5\cdot\text{HCl}$) is dissolved.

Test 3: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 3*.

Medium: pH 6.8 phosphate buffer; 1000 mL

Apparatus 1: 100 rpm

Time: 60 min

Buffer: Dissolve 1.38 g of monobasic sodium phosphate in about 1800 mL of water. Add 3.484 g of 1-pentanesulfonic acid sodium salt. Adjust with diluted phosphoric acid to a pH of 3.00 ± 0.05 . Dilute with water to 2000 mL.

Mobile phase: Acetonitrile and *Buffer* (1:19)

Standard stock solution: 0.25 mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*. Use sonication to dissolve.

Standard solution: 0.05 mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium* from the *Standard stock solution*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a nylon filter of 0.45- μ m pore size. Dilute with *Medium*, if necessary, to obtain a solution with a concentration similar to that of the *Standard solution*.

Chromatographic system

(See [Chromatography \(621\)](#), [System Suitability](#).)

Mode: LC

Detector: UV 230 nm

Column: 4.6-mm \times 25-cm; 5- μ m packing L1

Flow rate: 1.0 mL/min

Injection volume: 40 μ L

System suitability

Sample: *Standard solution*

Suitability requirements

Tailing factor: NMT 2.0

Column efficiency: NLT 1500 theoretical plates

Relative standard deviation: NMT 2.0%

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/L) \times (V/D) \times 100$$

r_U = peak response from the *Sample solution*

r_S = peak response from the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

L = label claim (mg/Tablet)

V = volume of *Medium*, 1000 mL

D = dilution factor of the *Sample solution*

Tolerances: NLT 70% (Q) of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) is dissolved.

- **UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS (905):** Meet the requirements

IMPURITIES

• ORGANIC IMPURITIES

Mobile phase: 17 g/L of monobasic ammonium phosphate in water, adjusted with phosphoric acid to a pH of 3.0

System suitability stock solution: 0.25 mg/mL of metformin hydrochloride and 0.1 mg/mL of melamine in water

System suitability solution: Transfer 1.0 mL of the *System suitability stock solution* to a 50-mL volumetric flask, and dilute with *Mobile phase* to volume.

Sample solution: Weigh and finely powder NLT 20 Tablets. Transfer the amount of powder, equivalent to 500 mg of metformin hydrochloride, to a 100-mL volumetric flask. Dissolve in *Mobile phase* with shaking, dilute with *Mobile phase* to volume, and filter.

Diluted sample solution: Nominally 0.005 mg/mL of metformin hydrochloride in *Mobile phase* from the *Sample solution*

Chromatographic system

(See [Chromatography \(621\)](#), [System Suitability](#).)

Mode: LC

Detector: UV 218 nm

Column: 4.6-mm × 25-cm; packing L9

Flow rate: 1.0–1.7 mL/min

Run time: NLT twice the retention time of metformin

Injection volume: 20 µL

System suitability

Sample: *System suitability solution*

Suitability requirements

Resolution: NLT 10 between melamine and metformin

Analysis

Samples: *Sample solution* and *Diluted sample solution*

Calculate the percentage of any individual impurity in the portion of the Tablets taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times D \times 100$$

r_U = peak response of any individual impurity from the *Sample solution*

r_S = peak response of metformin from the *Diluted sample solution*

D = dilution factor for the preparation of the *Diluted sample solution*, 0.001

Acceptance criteria

Any individual impurity: NMT 0.1%

Total impurities: NMT 0.6%

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in tight containers. Store at controlled room temperature.
- **LABELING:** When more than one *Dissolution* test is given, the labeling states the *Dissolution* test used only if *Test 1* is not used.
- **USP REFERENCE STANDARDS (11).**

USP Metformin Hydrochloride RS 

Auxiliary Information— Please [check for your question in the FAQs](#) before contacting USP.

Topic/Question	Contact	Expert Committee
Monograph	Elena Gonikberg, Ph.D. Director - Chemical Medicines (301) 816-8251	(CHM32015) Chemical Medicines Monographs 3
(197)	Edmond Biba, Ph.D. Scientific Liaison-General Chapters (301) 230-3270	(GCCA2015) General Chapters-Chemical Analysis 2015
(191)	Antonio Hernandez-Cardoso, M.Sc. Senior Scientific Liaison (301) 816-8308	(GCCA2015) General Chapters-Chemical Analysis 2015

Topic/Question	Contact	Expert Committee
<711>	Margareth R.C. Marques, Ph.D. Principal Scientific Liaison (301) 816-8106	(GCDF2015) General Chapters-Dosage Forms 2015
<905>	William E. Brown Senior Scientific Liaison (301) 816-8380	(GCDF2015) General Chapters-Dosage Forms 2015
Reference Standards	RS Technical Services 1-301-816-8129 rstech@usp.org	

USP40-NF35 Page 5048

Previously Appeared In:

Pharmacopeial Forum: Volume No. 40(4)

Glyburide and Metformin Hydrochloride Tablets

DEFINITION

Glyburide and Metformin Hydrochloride Tablets contain NLT 90.0% and NMT 110.0% of the labeled amounts of glyburide ($C_{23}H_{39}ClN_5O_5S$) and metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$).

IDENTIFICATION

- **A. GLYBURIDE:** The retention time of the glyburide peak of the Sample solution corresponds to that of the major peak of the Standard solution, as obtained in the Assay for Glyburide.
- **B. METFORMIN HYDROCHLORIDE:** The retention time of the major peak of the Sample solution corresponds to that of the Standard solution, as obtained in the Assay for Metformin Hydrochloride.

ASSAY

• **GLYBURIDE**

Solution A: 28.8 g/L of monobasic ammonium phosphate

Mobile phase: Acetonitrile and Solution A (40:60). Adjust with 1 N sodium hydroxide to a pH of 5.3.

Diluent: Acetonitrile and water (50:50)

Standard stock solution: 0.25 mg/mL of USP Glyburide RS prepared as follows: Dissolve first in the acetonitrile, using 50% of the final volume, and then dilute with water to volume.

Standard solution: 0.025 mg/mL of USP Glyburide RS in Diluent, from the Standard stock solution

System suitability solution 1: Prepare a solution containing 0.025 mg/mL of USP Glyburide Related Compound A RS in Diluent. Transfer 50 μ L of this solution to a 50-mL volumetric flask, and dilute with Standard solution to volume.

System suitability solution 2: 5.0 mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in System suitability solution 1

Sample solution: Dissolve NLT 5 Tablets in Diluent by stirring with a magnetic stirring bar for at least 1 h. Dilute to obtain a solution containing 0.025 mg/mL of glyburide, based on the label claim. Centrifuge a portion of this solution at 3000 rpm for 10 min and use the clear supernatant. **NOTE—**Retain a portion of this solution for the Assay for Metformin Hydrochloride.]

Chromatographic system

(See [Chromatography \(521\)](#), [System Suitability](#).)

Mode: LC

Detector: UV 230 nm

Column: 4.6-mm X 15-cm; 5- μ m packing L7

Column temperature: 40^o

Flow rate: 1.2 mL/min

Injection size: 100 μ L

System suitability

Sample: System suitability solution 2

NOTE—The relative retention time for the peak due to glyburide related compound A is about 0.30 with respect to glyburide.]

Suitability requirements

Capacity factor, k' : NLT 7 for the peak due to glyburide

Column efficiency: NLT 3000 theoretical plates for the peak due to glyburide

Relative standard deviation: NMT 1.5% for the peak due to glyburide

Relative standard deviation: NMT 10% for the peak due to glyburide related compound A

Analysis

Samples: Standard solution and Sample solution

Record the chromatograms for about 1.25 times the retention time of the glyburide peak. Calculate the percentage of $C_{23}H_{39}ClN_5O_5S$ in the Tablets taken:

$$\text{Result} = (n_U/r_U) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U	=	= peak response from the <i>Sample solution</i>
r_S	=	= peak response from the <i>Standard solution</i>
C_S	=	= concentration of USP Glyburide RS in the <i>Standard solution</i> (mg/mL)
C_U	=	= nominal concentration of glyburide in the <i>Sample solution</i> (mg/mL)

Acceptance criteria: 90.0%–110.0% of glyburide label claim

• METFORMIN HYDROCHLORIDE

Solution A: Transfer 1.0 g each of sodium heptanesulfonate and sodium chloride to a 2000-mL volumetric flask. Add 1800 mL of water, and adjust with 0.06 M phosphoric acid to a pH of 3.85. Dilute with water to volume.

Mobile phase: Acetonitrile and Solution A (10:90)

Diluent: Acetonitrile and water (1:40)

Standard solution: 0.25 mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in *Diluent*. **NOTE**—Sonicate to achieve complete dissolution, if necessary.)

System suitability stock solution: 25 µg/mL each of USP Metformin Related Compound B RS and USP Metformin Related Compound C RS in *Diluent*

System suitability solution: Transfer 0.5 mL of the *System suitability stock solution* to a 50-mL volumetric flask, and dilute with *Standard solution* to volume.

Sample solution: Dilute with water a portion of the retained *Sample solution* from the Assay for Glyburide to obtain 0.25 mg/mL of metformin hydrochloride based on the label claim.

Chromatographic system

(See [Chromatography](#), [621](#), [System Suitability](#).)

Mode: LC

Detector: UV 218 nm

Column: 3.9-mm X 30-cm; 10-µm packing L1

Column temperature: 30^o

Flow rate: 1 mL/min

Injection size: 5 µL

System suitability

Sample: *System suitability solution*

NOTE—The relative retention times for metformin related compound B, metformin, and metformin related compound C are about 0.86, 1.0, and 2.1–2.3, respectively. (Metformin related compound C can have a variable retention time.))

Suitability requirements

Resolution: NLT 1.5 between metformin related compound B and metformin

Tailing factor: 0.8–2.0 for the metformin peak

Relative standard deviation: NMT 1.5% for the metformin peak and NMT 10% for each of the peaks due to metformin related compound B and metformin related compound C.

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the percentage of C₄H₁₁N₅·HCl in the Tablets taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U	=	= peak response from the <i>Sample solution</i>
r_S	=	= peak response from the <i>Standard solution</i>
C_S	=	= concentration of USP Metformin Hydrochloride RS in the <i>Standard</i>

$$C_u = \frac{\text{solution (mg/mL)}}{\text{nominal concentration of metformin hydrochloride in the Sample solution (mg/mL)}}$$

Acceptance criteria: 90.0%–110.0% of metformin label claim

PERFORMANCE TESTS

• [DISSOLUTION](#) (711)

Glyburide

Medium: 0.05 M boric acid and 0.05 M potassium chloride solution. Prepare by dissolving 3.09 g of boric acid and 3.73 g of potassium chloride in 250 mL of water, adjust with 1 N sodium hydroxide to a pH of 9.5, and dilute with water to 1 L; 500 mL.

Apparatus 2: 75 rpm

Time: 30 min

Standard solution: Transfer 10 mg of USP Glyburide RS to a 100-mL volumetric flask. Dissolve in 20 mL of acetonitrile, and dilute with M medium to volume. Dilute further with M medium to obtain a solution having a glyburide concentration, in mg/mL, of $L/500$ where L is the label claim, in mg, of glyburide.

Sample solution: Sample per [Dissolution](#) (711). Pass a portion of the solution under test through a 0.45- μ m polypropylene filter or a 1- μ m glass fiber filter. Dilute with M medium, if necessary.

Solution A: 28.7 mg/mL of monobasic ammonium phosphate in water

Mobile phase: Solution A and acetonitrile (1:1). Adjust with 1 N sodium hydroxide to a pH of 5.3.

Chromatographic system

(See [Chromatography](#) (621), [System Suitability](#).)

Mode: LC

Detector: UV 230 nm

Column: 4.6-mm X 15-cm; 5- μ m packing L7

Column temperature: 30°

Flow rate: 1.5 mL/min

Injection size: 200 μ L

System suitability

Sample: Standard solution

Suitability requirements

Column efficiency: NLT 5000

Tailing factor: 0.8–2.0

Relative standard deviation: NMT 2%

Analysis

Samples: Standard solution and Sample solution

Determine the percentage of $C_{23}H_{29}ClN_3O_5S$ dissolved:

$$\text{Result} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

r_u = = peak response from the Sample solution

r_s = = peak response from the Standard solution

C_s = = concentration of the Standard solution (mg/mL)

C_u = = nominal concentration of glyburide in the Sample solution (mg/mL)

Tolerances: NLT 85% (Q) of the labeled amount of glyburide is dissolved.
Metformin hydrochloride

Metformin Hydrochloride Extended-Release Tablets

DEFINITION

Metformin Hydrochloride Extended-Release Tablets contain NLT 90.0% and NMT 110.0% of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$).

IDENTIFICATION

- **A.** The retention time of the major peak from the *Sample solution* corresponds to that from the *Standard solution*, as obtained in the *Assay*.

ASSAY

• PROCEDURE

Buffer solution: 0.5 g/L of [sodium 1-heptanesulfonate](#) and 0.5 g/L of [sodium chloride](#) in water. Before final dilution, adjust with 0.06 M [phosphoric acid](#) to a pH of 3.85.

Mobile phase: [Acetonitrile](#) and *Buffer solution* (1:9). [NOTE—To improve the separation, the composition of [acetonitrile](#) and *Buffer solution* may be changed to 1:19, if necessary.]

Diluent: 1.25% solution of [acetonitrile](#) in water

Standard solution: ($L/4000$) mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in *Diluent*, where L is the labeled quantity, in mg, of metformin hydrochloride in each Tablet

System suitability stock solution: 12.5 µg/mL each of USP Metformin Related Compound B RS and USP Metformin Related Compound C RS in *Diluent*

System suitability solution: Dilute 0.5 mL of the *System suitability stock solution* with the *Standard solution* to 50 mL.

Sample stock solution: Finely powder NLT 10 Tablets. Transfer powder, equivalent to the average Tablet weight, to a homogenization vessel, and add 500 mL of a 10% [acetonitrile](#) solution. Alternately, homogenize and allow to soak until the sample is fully homogenized. [NOTE—A suggested homogenization sequence is as follows. Homogenize the sample using five pulses, each of 5 s, at about 20,000 rpm, and allow to soak for 2 min. Repeat these steps two additional times.]

Sample solution: Pass a portion of the *Sample stock solution* through a suitable filter of 0.45-µm pore size, discarding the first 3 mL of filtrate. Transfer 25 mL of the filtrate to a 200-mL volumetric flask, and dilute with water to volume.

Chromatographic system

(See [Chromatography \(621\)](#), [System Suitability](#).)

Mode: LC

Detector: UV 218 nm

Column: 3.9-mm × 30-cm; 10-µm packing [L1](#)

Column temperature: 30°

Flow rate: 1 mL/min

Injection volume: 10 µL

Run time: Until after the elution locus of metformin related compound C

System suitability

Sample: *System suitability solution*

[NOTE—The relative retention times for metformin related compound B, metformin, and metformin related compound C are 0.86, 1.0, and 2.1–2.3, respectively. Metformin related compound C can have a variable retention time. The composition of the *Mobile phase* may be changed to 1:19, if it elutes at a relative retention time of less than 2.1.]

Suitability requirements

Resolution: NLT 1.5 between the peaks due to metformin related compound B and metformin

Tailing factor: NLT 0.8 and NMT 2.0 for the metformin peak

Relative standard deviation: NMT 1.5% for the metformin peak and NMT 10% for each of the peaks due to metformin related compound B and metformin related compound C

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) in the portion of Tablets taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U = peak response from the *Sample solution*

r_S = peak response from the *Standard solution*

C_S = concentration of USP Metformin Hydrochloride RS in the *Standard solution* (mg/mL)

C_U = nominal concentration of metformin hydrochloride in the *Sample solution*

Acceptance criteria: 90.0%–110.0%

PERFORMANCE TESTS

Change to read:

- **DISSOLUTION** (711).

Test 1

Medium: [pH 6.8 phosphate buffer solution](#); 1000 mL

Apparatus 1: 100 rpm for Tablets labeled to contain 750 mg

Apparatus 2: 100 rpm for Tablets labeled to contain 500 mg

Times: 1, 3, and 10 h

Detector: UV 232 nm

Standard solution: USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable hydrophilic polyethylene filter of 0.45- μ m pore size. Dilute, if necessary, with *Medium* to a concentration similar to that of the *Standard solution*.

Analysis: Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) released at each time point:

$$\text{Result} = [(A_U/A_S) \times C_S \times (V - V_S) + (C_{60} \times V_S) + (C_{180} \times V_S)] \times (100/L)$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

V = initial volume of *Medium* in the vessel (mL)

V_S = volume withdrawn from the vessel for previous samplings (mL)

C_{60} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 1 h (mg/mL)

C_{180} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 3 h (mg/mL)

L = label claim (mg/Tablet)

Tolerances: See [Table 1](#).

Table 1

Time (h)	Amount Dissolved, 500-mg Tablet (%)	Amount Dissolved, 750-mg Tablet (%)
1	20–40	22–42
3	45–65	49–69
10	NLT 85	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 2: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 2*.

Medium: Prepare as directed for *Test 1*; 1000 mL.

Apparatus 2: 100 rpm

Times: 1, 2, 6, and 10 h

Detector: UV 232 nm

Standard solution: USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable polyethylene filter of 0.45- μ m pore size. Dilute, if necessary, with *Medium* to a concentration that is similar to that of the *Standard solution*.

Analysis: Calculate, in mg/mL, the content of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$), C_t , in *Medium* at each time point, t :

$$\text{Result} = (A_U \times C_S \times D_U)/A_S$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

C_S = concentration of metformin hydrochloride in the *Standard solution* (mg/mL)

D_U = dilution factor of the solution under test

A_S = absorbance of the *Standard solution*

Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at each time point by the following formulas.

Percentage dissolved at the first time point (1 h):

$$\text{Result} = (C_1 \times V \times 100)/L$$

C_1 = content of metformin hydrochloride in *Medium* at the first time interval (mg/mL)

V = volume of *Medium*, 1000 mL

L = label claim (mg/Tablet)

Percentage dissolved at the second time point (2 h):

$$\text{Result} = [C_2 \times (V - SV_1) + C_1 \times SV_1] \times (100/L)$$

C_2 = content of metformin hydrochloride in *Medium* at the second time interval (mg/mL)

V = volume of *Medium*, 1000 mL

SV_1 = volume of the sample withdrawn at 1 h (mL)

C_1 = content of metformin hydrochloride in *Medium* at 1 h (mg/mL)

L = label claim (mg/Tablet)

Percentage dissolved at the n th time point:

$$\text{Result} = \{C_n \times [V - (n - 1)V_S] + (C_1 + C_2 + \dots + C_{n-1}) \times V_S\} \times (100/L)$$

C_n = content of metformin hydrochloride in *Medium* at the n th time interval (mg/mL)

V = volume of *Medium*, 1000 mL

n = time interval of interest

V_S = volume of sample withdrawn at each time interval (mL)

C = as $C_1, C_2, C_3, \dots, C_{n-1}$, the content of metformin hydrochloride in *Medium* at each time interval (mg/mL)

L = label claim (mg/Tablet)

Tolerances: See [Table 2](#).

Table 2

Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	20–40
2	35–55
6	65–85
10	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 3: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 3*.

Medium, Apparatus 1, and Apparatus 2 • (ERR 1-Jun-2016): Proceed as directed in *Test 1*.

Times: 1, 2, 5, and 12 h for Tablets labeled to contain 500 mg; and 1, 3, and 10 h for Tablets labeled to contain 750 mg

Detector: UV 232 nm

Standard solution: USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable hydrophilic polyethylene filter of 0.45- μ m pore size. Dilute, if necessary, with *Medium* to a concentration similar to that of the *Standard solution*.

Analysis: Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) released at each time point:

$$\text{Result} = \{[(A_U/A_S) \times C_S \times (V - V_S) + (C_{60} \times V_S) + (C_{120} \times V_S) + (C_{300} \times V_S) + (C_{720} \times V_S)] \times 100\}/L$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

V = initial volume of *Medium* in the vessel (mL)

V_S = volume withdrawn from the vessel for previous samplings (mL)

C_{60} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 1 h (mg/mL)

C_{120} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 2 h (mg/mL)

C_{300} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 5 h (mg/mL)

C_{720} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 12 h (mg/mL)

L = label claim (mg/Tablet)

Tolerances: See [Tables 3](#) and [4](#).

Table 3. For Tablets Labeled to Contain 500 mg

Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	20–40
2	35–55
5	60–80
12	NLT 85

Table 4. For Tablets Labeled to Contain 750 mg

Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	22–42
3	49–69
10	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 4: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 4*.

Medium: Prepare as directed for *Test 1*; 1000 mL.

Apparatus 2: 100 rpm

Times: 1, 3, 6, and 10 h

Detector: UV 250 nm (shoulder)

Standard solution: USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable filter of 0.45- μ m pore size. Dilute, if necessary, with *Medium* to a concentration similar to that of the *Standard solution*.

Analysis: Calculate, in mg/mL, the content of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$), C_t , in *Medium* at each time point, t , by the formulas specified in *Test 2*.

Tolerances: See [Table 5](#).

Table 5

Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	20–40
3	45–65
6	65–85
10	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 5: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 5*.

Medium: [pH 6.8 phosphate buffer solution](#); 900 mL, deaerated

Apparatus 1: 100 rpm, with the vertical holder described in [Figure 1](#) and [Figure 2](#)

Times: 2, 8, and 16 h

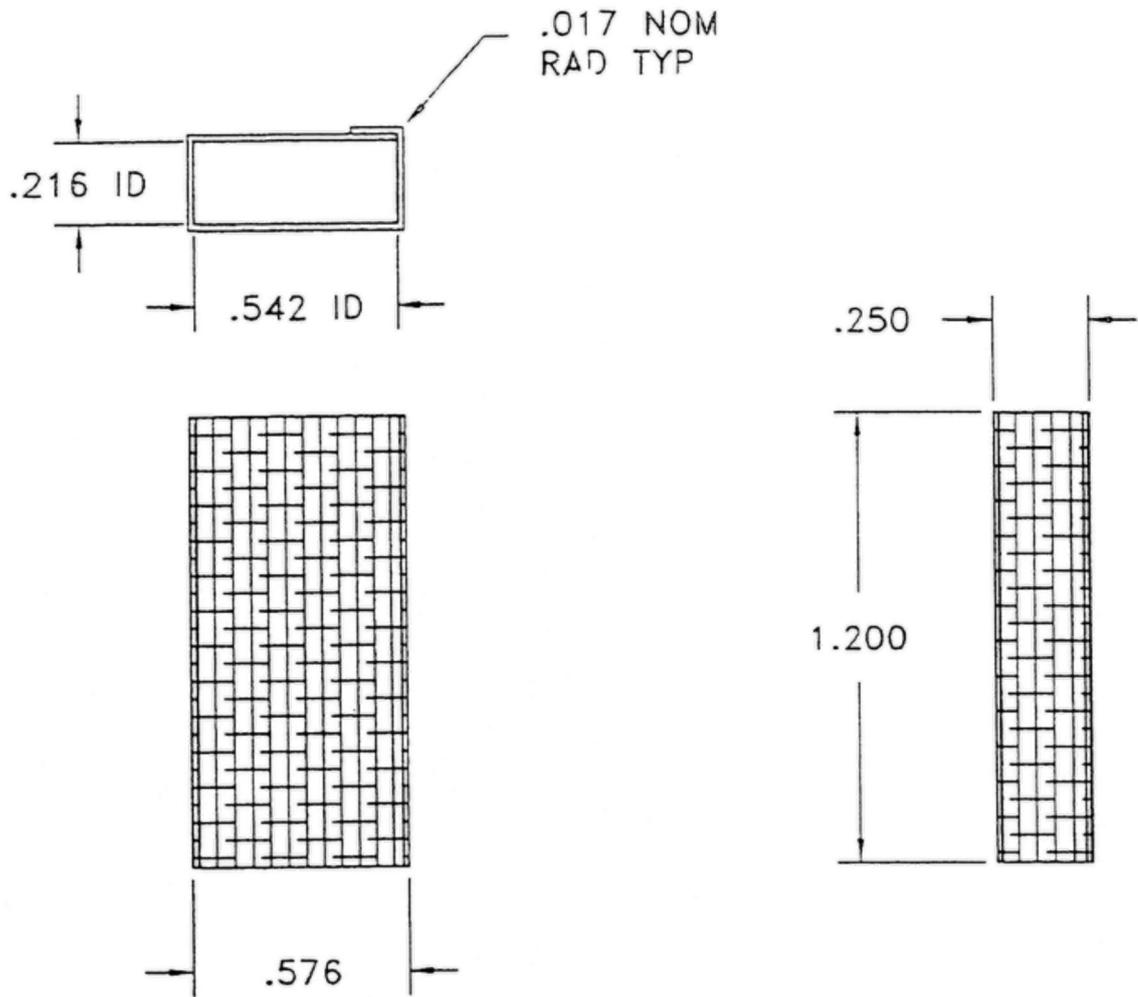
Detector: UV 250 nm

Standard solution: USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable filter of 0.45- μ m pore size. Dilute, if necessary, with *Medium* to a concentration similar to that of the *Standard solution*.

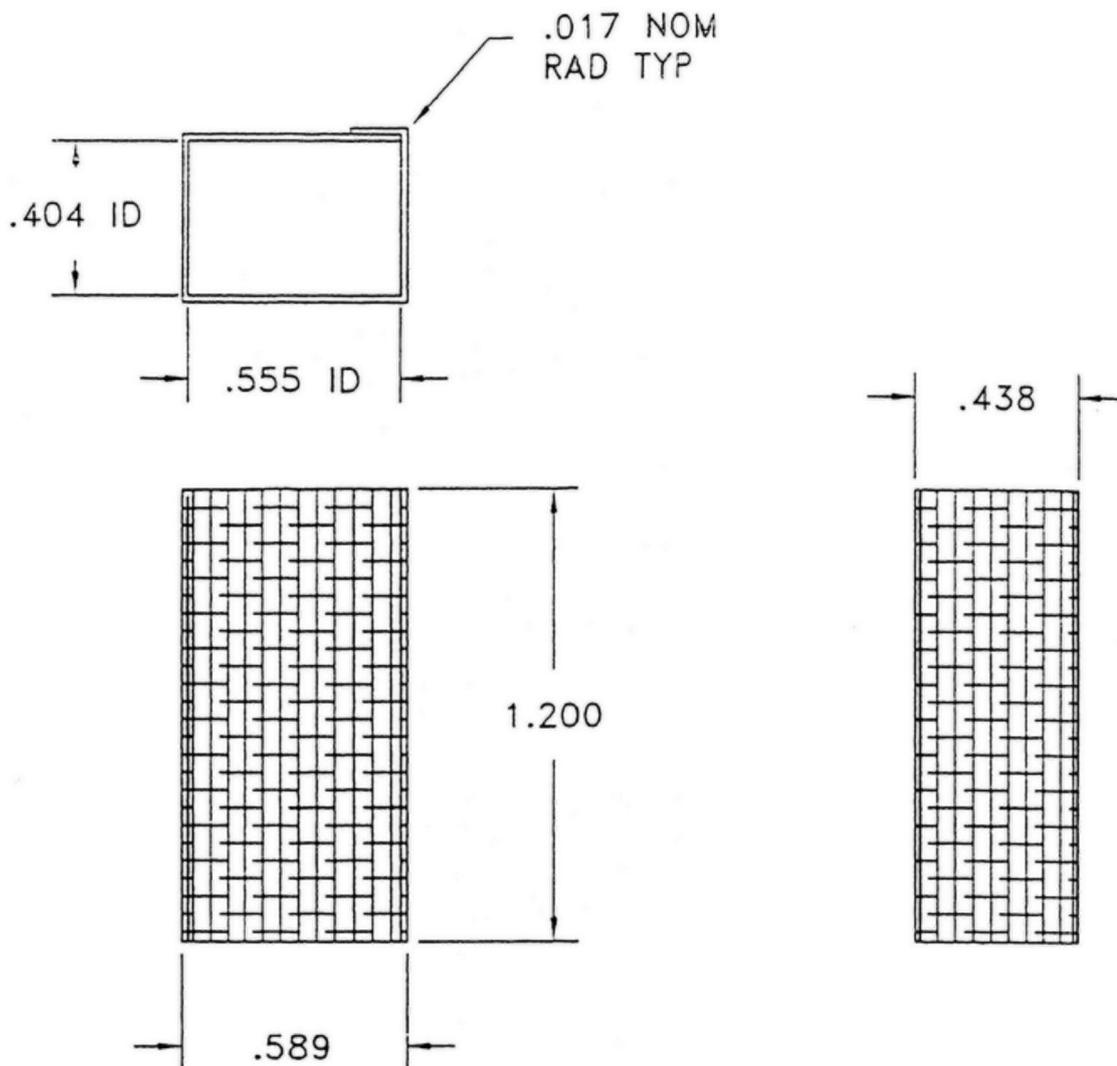
Analysis: Place a vertical sample holder into each basket (see [Figures 1](#) and [2](#)). Place 1 Tablet inside the sample holder, making sure that the Tablets are vertical at the bottom of the baskets.

Calculate, in mg/mL, the content of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$), C_t , in *Medium* at each time point, t , by the formulas specified in *Test 2*.

**NOTES:**

1. MATERIAL: 316SS OR EQUIVALENT .017 WIRE VERTICAL MEAS SQUARE WEAVE WITH .039 SQUARE OPENINGS.
2. ALL DIMENSIONS ARE IN INCHES. TOLERANCES TO BE +/- .010

Figure 1



NOTES:

1. MATERIAL: 316SS OR EQUIVALENT .017 WIRE VERTICAL MEAS SQUARE WEAVE WITH .039 SQUARE OPENINGS.
2. ALL DIMENSIONS ARE IN INCHES. TOLERANCES TO BE +/- .010

Figure 2

Tolerances: See [Table 6](#).

Table 6

Time (h)	Amount Dissolved, 500-mg Tablet (%)	Amount Dissolved, 1000-mg Tablet (%)
2	NMT 30	NMT 30
8	60-85	65-90
16	NLT 90	NLT 90

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 6: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 6*.

Medium: [pH 6.8 phosphate buffer solution](#); 1000 mL, deaerated

Apparatus 2: 100 rpm, with USP sinker, if necessary

Detector: UV 233 nm

Standard solution: USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable hydrophilic polyethylene filter of 0.45- μ m pore size. Dilute, if necessary, with *Medium* to a concentration similar to that of the *Standard solution*.

Analysis: Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) released at each time point:

$$\text{Result} = \{[(A_U/A_S) \times C_S \times (V - V_S) + (C_{60} \times V_S) + (C_{180} \times V_S) + (C_{600} \times V_S)] \times 100\}/L$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

V = initial volume of *Medium* in the vessel (mL)

V_S = volume withdrawn from the vessel for previous samplings (mL)

C_{60} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 1 h (mg/mL)

C_{180} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 3 h (mg/mL)

C_{600} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 10 h (mg/mL)

L = label claim (mg/Tablet)

Tolerances: See [Table 7](#).

Table 7

Time (h)	Amount Dissolved, 500-mg Tablet (%)	Amount Dissolved, 750-mg Tablet (%)
1	20–40	20–40
3	45–65	45–65
10	NLT 85	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 7: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 7*.

Medium: Prepare as directed in *Test 1*; 1000 mL.

Apparatus 1: 100 rpm for Tablets labeled to contain 750 mg

Apparatus 2: 50 rpm, with USP sinker, for Tablets labeled to contain 500 mg

Times: 1, 3, and 10 h

Detector: UV 232 nm

Standard solution: USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable filter of 0.45- μ m pore size. Dilute, if necessary, with *Medium* to a concentration similar to that of the *Standard solution*.

Analysis: Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) released at each time point:

$$\text{Result} = \{[(A_U/A_S) \times C_S \times (V - V_S) + (C_{60} \times V_S) + (C_{180} \times V_S) + (C_{600} \times V_S)] \times 100\}/L$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

V = initial volume of *Medium* in the vessel (mL)

V_S = volume withdrawn from the vessel for previous samplings (mL)

C_{60} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 1 h (mg/mL)

C_{180} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 3 h (mg/mL)

C_{600} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 10 h (mg/mL)

L = label claim (mg/Tablet)

Tolerances: See [Table 8](#).

Table 8

Time (h)	Amount Dissolved, 500-mg Tablet (%)	Amount Dissolved, 750-mg Tablet (%)
1	20–40	20–40
3	45–65	40–60
10	NLT 85	NLT 80

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 8: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 8*.

Medium: Prepare as directed in *Test 1*; 1000 mL.

Apparatus 1: 100 rpm for Tablets labeled to contain 750 mg

Apparatus 2: 100 rpm, with sinker, for Tablets labeled to contain 500 mg

Times: 1, 2, 6, and 10 h

Detector: UV 232 nm

Standard solution: USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable filter of 0.45- μ m pore size. Dilute, if necessary, with *Medium* to a concentration similar to that of the *Standard solution*.

Analysis: Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) released at each time point:

$$\text{Result} = \{[(A_U/A_S) \times C_S \times (V - V_S) + (C_{60} \times V_S) + (C_{120} \times V_S) + (C_{360} \times V_S) + (C_{600} \times V_S)] \times 100\}/L$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

V = initial volume of *Medium* in the vessel (mL)

V_S = volume withdrawn from the vessel for previous samplings (mL)

C_{60} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 1 h (mg/mL)

C_{120} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 2 h (mg/mL)

C_{360} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 6 h (mg/mL)

C_{600} = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at 10 h (mg/mL)

L = label claim (mg/Tablet)

Tolerances: See [Table 9](#).

Table 9

Time (h)	Amount Dissolved, 500-mg Tablet (%)	Amount Dissolved, 750-mg Tablet (%)
1	20–40	20–40
2	30–50	35–55
6	65–85	75–95
10	NLT 85	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 9: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 9*.

Medium: 0.05 M phosphate buffer, pH 6.8; 1000 mL

Apparatus 1: 100 rpm, for Tablets labeled to contain 750 mg

Apparatus 2: 100 rpm, for Tablets labeled to contain 500 mg

Times: 1, 5, 12, and 20 h for Tablets labeled to contain 500 mg; and 1, 4, 10, and 24 h for Tablets labeled to contain 750 mg

Standard solution: 0.5 mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: Pass a portion of the solution under test through a suitable filter of 0.45- μ m pore size.

Detector: UV 232 nm

Path length: 0.01 cm, flow cell

Blank: *Medium*

Analysis: Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) released at each time point:

$$\text{Result} = \{[(A_U/A_S) \times C_S \times (V - V_S) + (C_1 \times V_S) + (C_2 \times V_S) + (C_3 \times V_S) + (C_4 \times V_S)] \times 100\}/L$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

V = initial volume of *Medium* in the vessel (mL)

V_S = volume withdrawn from the vessel for previous samplings (mL)

C_1 = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at the first time point (mg/mL)

C_2 = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at the second time point (mg/mL)

C_3 = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at the third time point (mg/mL)

- C_4 = concentration of metformin hydrochloride in *Medium* determined at the fourth time point (mg/mL)
 L = label claim (mg/Tablet)

Tolerances: See [Tables 10](#) and [11](#).

Table 10. For Tablets Labeled to Contain 500 mg

Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	20–40
5	45–65
12	70–90
20	NLT 85

Table 11. For Tablets Labeled to Contain 750 mg

Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	20–45
4	45–70
10	70–95
24	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 10: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 10*.

Medium: 0.05 M phosphate buffer (prepared by dissolving 6.8 g of *monobasic potassium phosphate* in 250 mL of water, adding 77 mL of [0.2 N sodium hydroxide](#) and 500 mL of water, adjusting with [2 N sodium hydroxide](#) or 2 N hydrochloric acid to a pH 6.8, and diluting with water to 1000 mL)

Apparatus 1: 100 rpm for Tablets labeled to contain 750 mg

Apparatus 2: 100 rpm for Tablets labeled to contain 500 mg

Times: 1, 3, and 10 h

Standard solution: ($L/100,000$) mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*, where L is the label claim, in mg/Tablet. This solution is stable for 72 h at room temperature.

Sample solution: At the times specified, withdraw 10 mL of the solution under test and replace with 10 mL of *Medium* previously equilibrated at $37.0 \pm 0.5^\circ$. Centrifuge at 2500 rpm for 10 min. Dilute a portion of the supernatant with *Medium* to obtain a theoretical concentration of ($L/100,000$) mg/mL, where L is the label claim, in mg/Tablet.

Detector: UV 233 nm

Path length: 1 cm

Blank: *Medium*

Analysis: Calculate the concentration (mg/mL) of metformin hydrochloride (C_i) at each time point:

$$C_i = (A_U/A_S) \times C_S$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

Calculate the cumulative percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved (Q_i) at each time point (i):

At $i = 1$:

$$Q_1 = (C_1 \times V/L) \times 100$$

At $i = 3$:

$$Q_3 = [C_3(V - V_S) + (C_1 \times V_S)] \times 100/L$$

At $i = 10$:

$$Q_{10} = [C_{10}(V - 2V_S) + (C_1 + C_3)V_S] \times 100/L$$

V = initial volume of *Medium*, 1000 mL

V_S = sampling volume, 10 mL

L = label claim (mg/Tablet)

Tolerances: See [Table 12](#).

Table 12

Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	25–45
3	50–70
10	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 11: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 11*.

Medium: [pH 6.8 phosphate buffer solution](#); 1000 mL

Apparatus 1: 100 rpm for Tablets labeled to contain 750 mg

Apparatus 2: 100 rpm for Tablets labeled to contain 500 mg

Times: 1, 3, and 10 h

Standard solution: 7.5 µg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Sample solution: At the times specified, withdraw 10 mL of the solution under test, and pass it through a suitable filter of 0.45-µm pore size, discarding the first 3 mL of filtrate. Dilute 3.0 mL of the filtrate with *Medium* to 200 mL. For Tablets labeled to contain 750 mg, dilute 2.0 mL of the filtrate with *Medium* to 200 mL. Replace the volume of *Medium* taken with the same volume of *Medium* preheated at $37.0 \pm 0.5^\circ$.

Detector: UV 232 nm

Path length: 1 cm

Blank: *Medium*

Analysis: Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at each time point:

$$Q_i = (A_U/A_S) \times (C_S/L) \times V \times D \times 100$$

At 1 h:

$$\text{Result} = Q_1$$

At 3 h:

$$\text{Result} = Q_3 + [(Q_1 \times 10)/V]$$

At 10 h:

$$\text{Result} = Q_{10} + \{[(Q_1 \times 10)/V] + [(Q_3 \times 10)/V]\}$$

A_U = absorbance of the Sample solution

A_S = absorbance of the Standard solution

C_S = concentration of the Standard solution (mg/mL)

L = label claim (mg/Tablet)

V = volume of *Medium*, 1000 mL

D = dilution factor of the Sample solution

Tolerances: See [Table 13](#).

Table 13

Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	25–45
3	50–70
10	NLT 80

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 12: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 12*.

Medium: [pH 6.8 phosphate buffer solution](#); 1000 mL

Apparatus 1: 100 rpm

Times: 1, 4, and 12 h

Standard stock solution: 0.2 mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in *Medium*

Standard solution: 0.01 mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS in water, from the *Standard stock solution*

Sample solution: At the times specified, withdraw 10 mL of the solution under test, and replace with 10 mL of *Medium* previously equilibrated at $37.0 \pm 0.5^\circ$. Pass it through a suitable filter, discarding the first few mL of the filtrate.

For Tablets labeled to contain 500 mg: Dilute 2.0 mL of the filtrate with water to 100 mL.

For Tablets labeled to contain 1000 mg: Dilute 1.0 mL of the filtrate with water to 100 mL.

Detector: UV 232 nm

Blank: Dilute 1 mL of *Medium* with water to 100 mL.

Analysis: Calculate the concentration, C_i , in mg/mL of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) in the sample withdrawn at each time point (i):

$$\text{Result}_i = (A_U/A_S) \times C_S \times D$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

D = dilution factor of the *Sample solution*

Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved (Q_i) at each time point (i):

$$\text{Result}_1 = C_1 \times V \times (1/L) \times 100$$

$$\text{Result}_2 = \{[C_2 \times V] + [C_1 \times V_S]\} \times (1/L) \times 100$$

$$\text{Result}_3 = \{[C_3 \times V] + [(C_2 + C_1) \times V_S]\} \times (1/L) \times 100$$

C_i = concentration of metformin hydrochloride in the portion of sample withdrawn at time point i (mg/mL)

V = initial volume of *Medium*, 1000 mL

L = label claim (mg/Tablet)

V_S = volume of the *Sample solution* withdrawn, 10 mL

Tolerances: See [Table 14](#).

Table 14

Time point (i)	Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	1	NMT 15
2	4	35–65
3	12	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

Test 13: If the product complies with this test, the labeling indicates that it meets USP *Dissolution Test 13*.

Medium: [pH 6.8 phosphate buffer solution](#); 1000 mL

Apparatus 1: 100 rpm

Times: 1, 4, 6, and 14 h

Standard stock solution: 0.2 mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS prepared as follows. Transfer a suitable amount of USP Metformin Hydrochloride RS into an appropriate volumetric flask. Dissolve by adding *Medium* to fill 50% of the flask volume and dilute with *Medium* to volume.

Standard solution: 0.01 mg/mL of USP Metformin Hydrochloride RS from *Standard stock solution* in water

Sample stock solution: At the times specified, withdraw 10 mL of the solution under test, and replace with the same volume of *Medium* preheated at $37.0 \pm 0.5^\circ$. Pass a portion of the solution under test through a suitable filter of 0.45- μm pore size, discard the first few mL, and use the filtrate.

Sample solution

For Tablets labeled to contain 500 mg: Dilute 2 mL of *Sample stock solution* with water to 100 mL.

For Tablets labeled to contain 1000 mg: Dilute 1 mL of *Sample stock solution* with water to 100 mL.

Instrumental conditions

(See [Ultraviolet-Visible Spectroscopy \(857\)](#).)

Mode: UV

Analytical wavelength: 232 nm

Blank

For Tablets labeled to contain 500 mg: Dilute 2 mL of *Medium* with water to 100 mL.

For Tablets labeled to contain 1000 mg: Dilute 1 mL of *Medium* with water to 100 mL.

System suitability

Sample: *Standard solution*

Suitability requirements

Relative standard deviation: NMT 2.0%

Analysis

Samples: *Standard solution*, *Sample solution*, and *Blank*

Calculate the concentration (C_i), in mg/mL, of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) in the sample withdrawn from the vessel at each time point (i):

$$\text{Result}_i = (A_U/A_S) \times C_S \times D$$

A_U = absorbance of the *Sample solution*

A_S = absorbance of the *Standard solution*

C_S = concentration of the *Standard solution* (mg/mL)

D = dilution factor of the *Sample solution*

Calculate the percentage of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at each time point (i):

$$\text{Result}_1 = C_1 \times V \times (1/L) \times 100$$

$$\text{Result}_2 = [(C_2 \times V) + (C_1 \times V_S)] \times (1/L) \times 100$$

$$\text{Result}_3 = \{[C_3 \times V] + [(C_2 + C_1) \times V_S]\} \times (1/L) \times 100$$

$$\text{Result}_4 = \{[C_4 \times V] + [(C_3 + C_2 + C_1) \times V_S]\} \times (1/L) \times 100$$

C_i = concentration of metformin hydrochloride in the portion of sample withdrawn at the specified time point (mg/mL)

V = volume of *Medium*, 1000 mL

L = label claim (mg/Tablet)

V_S = volume of the *Sample solution* withdrawn at each time point and replaced with *Medium* (mL)

Tolerances: See [Table 15](#).

Table 15

Time point (i)	Time (h)	Amount Dissolved (%)
1	1	NMT 20
2	4	45–65
3	6	65–85
4	14	NLT 85

The percentages of the labeled amount of metformin hydrochloride ($C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$) dissolved at the times specified conform to [Dissolution \(711\)](#), [Acceptance Table 2](#).

- **UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS (905):** Meet the requirements

IMPURITIES

• ORGANIC IMPURITIES

Mobile phase, Sample solution, and Chromatographic system: Proceed as directed in the *Assay*.

Analysis: From the chromatogram of the *Sample solution* obtained in the *Assay*, calculate the percentage of each impurity in the portion of Tablets taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_T) \times 100$$

r_U = peak response for each impurity

r_T = sum of all the peak responses

Acceptance criteria

Individual impurities: NMT 0.1%

Total impurities: NMT 0.6%

[NOTE—Disregard any peak less than 0.05%, and disregard any peak observed in the blank.]

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in well-closed, light-resistant containers, and store at controlled room temperature.

- **LABELING:** When more than one dissolution test is given, the labeling states the *Dissolution* test used only if *Test 1* is not used.
- **USP REFERENCE STANDARDS (11)**
 - USP Metformin Hydrochloride RS 
 - USP Metformin Related Compound B RS 
 - 1-Methylbiguanide hydrochloride.
 - $C_3H_9N_5HCl$ 151.60
 - USP Metformin Related Compound C RS 
 - N,N*-Dimethyl-[1,3,5]triazine-2,4,6-triamine.
 - $C_5H_{10}N_6$ 154.17

Auxiliary Information— Please [check for your question in the FAQs](#) before contacting USP.

Topic/Question	Contact	Expert Committee
Monograph	Elena Gonikberg, Ph.D. Director - Chemical Medicines (301) 816-8251	(CHM32015) Chemical Medicines Monographs 3
<711>	Margareth R.C. Marques, Ph.D. Principal Scientific Liaison (301) 816-8106	(GCDF2015) General Chapters-Dosage Forms 2015
<905>	William E. Brown Senior Scientific Liaison (301) 816-8380	(GCDF2015) General Chapters-Dosage Forms 2015
Reference Standards	RS Technical Services 1-301-816-8129 rstech@usp.org	

USP40–NF35 Page 5050

Previously Appeared In:

Pharmacopeial Forum: Volume No. 40(4)

Relative Retention (r): Is the ratio of the adjusted retention time of a component relative to that of another used as a reference obtained under identical conditions:

$$r = t_{R2} - t_M / t_{R1} - t_M$$

where t_M is the retention time measured from the point of injection of the compound of interest; t_{R1} is the retention time measured from the point of injection of the compound used as reference; and t_{R2} is the retention time of a nonretained marker defined in the procedure, all determined under identical experimental conditions on the same column.

Relative Retention Time (RRT): Also known as unadjusted relative retention. Comparisons in USP are normally made in terms of unadjusted relative retention, unless otherwise indicated.

$$RRT = t_{R2} / t_{R1}$$

The symbol r_c is also used to designate unadjusted relative retention values.

Relative Standard Deviation in Percentage

$$\%RSD = \frac{100}{x} \left(\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1} \right)^{1/2}$$

Retardation Factor (R_f): The retardation factor is the ratio of the distance traveled by the center of the spot to the distance simultaneously traveled by the mobile phase and is used in planar chromatography. Using the symbols in Figure 3:

$$R_f = b/a$$

Retention Factor (k): The retention factor is also known as the capacity factor (k'). Defined as:

$$k = \frac{\text{amount of substance in stationary phase}}{\text{amount of substance in mobile phase}} \quad \text{or} \quad k = \frac{\text{time spent by substance in stationary phase}}{\text{time spent by substance in mobile phase}}$$

The retention factor of a component may be determined from the chromatogram:

$$k = (t_R - t_M) / t_M$$

Retention Time (t_R): In liquid chromatography and gas chromatography, the retention time, t_R , is defined as the time elapsed between the injection of the sample and the appearance of the maximum peak response of the eluted sample zone. t_R may be used as a parameter for identification. Chromatographic retention times are characteristic of the compounds they represent but are not unique. Coincidence of retention times of a sample and a reference substance can be used as a partial criterion in construction of an identity profile but may not be sufficient on its own to establish identity. Absolute retention times of a given compound may vary from one chromatogram to the next.

Retention Volume (V_R): The retention volume is the volume of mobile phase required for elution of a compo-

nent. It may be calculated from the retention time and the flow rate in mL/min:

$$V_R = t_R \times F$$

Resolution (R_s): The resolution is the separation of two components in a mixture, calculated by:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

where t_{R2} and t_{R1} are the retention times of the two components; and W_2 and W_1 are the corresponding widths at the bases of the peaks obtained by extrapolating the relatively straight sides of the peaks to the baseline.

Where electronic integrators are used, it may be convenient to determine the resolution, by the equation:

$$R_s = 1.18(t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0.05/2} + W_{0.05/2})$$

Separation Factor (α): The separation factor is the relative retention calculated for two adjacent peaks (by convention, the value of the separation factor is always >1):

$$\alpha = k_2 / k_1$$

Symmetry Factor (A_s): The symmetry factor (also known as the tailing factor) of a peak (see Figure 4) is calculated by:

$$A_s = W_{0.05} / 2f$$

where $W_{0.05}$ is the width of the peak at 5% height and f is the distance from the peak maximum to the leading edge of the peak, the distance being measured at a point 5% of the peak height from the baseline.

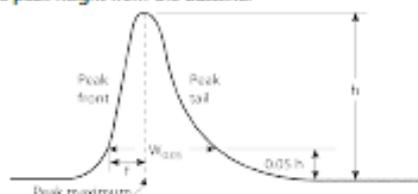


Figure 4. Asymmetrical chromatographic peak.

Tailing Factor (T): See Symmetry Factor.

SYSTEM SUITABILITY

System suitability tests are an integral part of gas and liquid chromatographic methods. These tests are used to verify that the chromatographic system is adequate for the intended analysis.

The tests are based on the concept that the equipment, electronics, analytical operations, and samples analyzed constitute an integral system that can be evaluated as such.

Factors that may affect chromatographic behavior include the following:

- Composition, ionic strength, temperature, and apparent pH of the mobile phase
- Flow rate, column dimensions, column temperature, and pressure
- Stationary phase characteristics, including type of chromatographic support (particle-based or monolithic),

It is also a common practice to measure the Asymmetry factor as the ratio of the distance between the vertical line connecting the peak apex with the interpolated baseline and the peak front, and the distance between that line and the peak back measured at 10% of the peak height (see Figure 4), which is $(W_{0.10} - t_{0.10}) / t_{0.10}$. However, for the purposes of USP, only the formula (A_s) as presented here is valid.

ANALYSIS CERTIFICATE

CODE: 361881

BATCH: 0001202938

PRODUCT: Acetonitrile for UV, IR, HPLC, ACS

ISSUE DATE: 05/09/2017

RETEST DATE: 08/2021

SPECIFICATIONS	GUARANTEE VALUE	ACTUAL VALUE
Minimum assay (G.C.)	99,9%	99,9%
Density 20/4	0,779-0,783	0,781
Maximum limit of impurities		
APHA colour	10	<10
Acidity	0,0005 meq/g	<0,0005 meq/g
Alkalinity	0,0001 meq/g	<0,0001 meq/g
Non-volatile matter	0,0004 %	0,0001 %
Base line drift (210 nm)	10 mUA	<10 mUA
Suitability for gradient according to ACS	passes test	Passes test
Water (H2O)	0,02 %	0,003 %
Suitability for IR spectrometry:	passes test	Passes test

Gradient

L (nm)	210	254							
A (mUA)	<1	<0,5							

Fluorescence (as quinine):

L (nm)	254	365							
A (ppb)	<1	<1							

UV Spectrum(1cm cell; Ref.:water)

L (nm)	190 (Cut off)	193	195	200	230-400				
A (UA)	< 1	<0,260	<0,155	<0,046	<0,009				
T (%)	34	70	83	93	99				

Microfiltered product (0.2 µm) and bottled under nitrogen atmosphere.

Panreac Química S.L.U.
C/Garraf, 2
Polígono Pla de la Bruguera
E-08211 Castellar del Vallès
(Barcelona) España
Tel. (+34) 937 489 400
Fax (+34) 937 489 401
e-mail: info.es@itwreagents.com
www.itwreagents.com



Quality Assurance Director
Director de Garantía Calidad
P. Verge

CODE: 361881

BATCH: 0001202938

Honeywell**CERTIFICATE OF ANALYSIS****Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH**

Wunstorferstrasse 40
Seelze, 30926
Telefon: +49 5137 8238-0
www.lab-honeywell.com

Brand: Honeywell Riedel-de Haën™
Product: 34851
Lot No: H2060
Production date: 25.Jul.2017
Best before: 15.Jul.2019

Acetonitrile CHROMASOLV, for HPLC, gradient grade, 99.9%

Parameter	Specification	Units	Result	Units
assay (GC)	min. 99.90	%	99.99	%
non-volatile matter	max. 0.0005	%	<0.0005	%
water (Karl Fischer)	max. 0.02	%	0.004	%
free acid (as CH ₃ COOH)	max. 0.001	%	<0.001	%
free alkali (as NH ₃)	max. 0.0002	%	<0.0002	%
absorbance at 400 nm	max. 0.0044		<0.0044	
absorbance at 250 nm	max. 0.0044		<0.0044	
absorbance at 235 nm	max. 0.0044		<0.0044	
absorbance at 230 nm	max. 0.0044		<0.0044	
absorbance at 200 nm	max. 0.032		<0.032	
absorbance at 195 nm	max. 0.12		<0.12	
fluorescence (chinin) at 254 nm	max. 1	ppb	<1	ppb
fluorescence (chinin) at 365 nm	max. 0.5	ppb	<0.5	ppb
HPLC-gradient at 210 nm	max. 3	mAU	<3	mAU
HPLC-gradient at 254 nm	max. 0.5	mAU	<0.5	mAU
baseline drift at 210 nm	max. 15	mAU	<15	mAU



QC Release Date: 31.Jul.2017

The minimum shelf life is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.

We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.

Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.

We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales.

Honeywell
Quality Management

This document was produced electronically and is valid without a signature

Certificate of Analysis

Material : 20624.295
Batch : 13D190511

Acide orthophosphorique 85% AnalaR NORMAPUR
Expires end of 04/2018

CHARACTERISTICS	SPECIFICATIONS	MEASURED VALUES
Titre	Min. 85,0 %	85,6 %
Coloration	Max. 10 APHA	Max. 10 APHA
Densité (20/4)	1,680 --> 1,710	1,690
Acides volatiles	Max. 0,0002 meq/g	Max. 0,0002 meq/g
Métaux lourds (en Pb)	Max. 5 ppm	Max. 5 ppm
Substances réductrices (en H3PO3)	Max. 50 ppm	Max. 50 ppm
Substances réduisant KMnO4 (en O)	Max. 10 ppm	Max. 10 ppm
Silicium dioxyde	Max. 0,025 %	Max. 0,025 %
Cl (Chlorure)	Max. 2 ppm	Max. 2 ppm
F (Fluorure)	Max. 1 ppm	Max. 1 ppm
NO2 (Nitrite)	Max. 0,05 ppm	0,02 ppm
NO3 (Nitrate)	Max. 5 ppm	Max. 5 ppm
SO4 (Sulfate)	Max. 50 ppm	Max. 50 ppm
As (Arsenic)	Max. 0,5 ppm	Max. 0,5 ppm
Ca (Calcium)	Max. 50 ppm	Max. 50 ppm
Cd (Cadmium)	Max. 1 ppm	Max. 1 ppm
Co (Cobalt)	Max. 1 ppm	Max. 1 ppm
Cu (Cuivre)	Max. 1 ppm	Max. 1 ppm
Fe (Fer)	Max. 5 ppm	Max. 5 ppm
K (Potassium)	Max. 5 ppm	Max. 5 ppm
Mg (Magnésium)	Max. 10 ppm	Max. 10 ppm
Mn (Manganèse)	Max. 0,5 ppm	Max. 0,5 ppm
Na (Sodium)	Max. 0,025 %	Max. 0,025 %
Ni (Nickel)	Max. 1 ppm	Max. 1 ppm
Pb (Plomb)	Max. 1 ppm	Max. 1 ppm
Sb (Antimoine)	Max. 5 ppm	Max. 5 ppm
Zn (Zinc)	Max. 2 ppm	Max. 2 ppm
Conforme à BDH 10173	Conforme	Conforme

VWR International S.A.S.

Le Périgares
 201 Rue Carnot
 94126 Fontenay-sous-Bois Cedex
 FRANCE



Certificate of Analysis

Material : 20624.295
Batch : 13D190511

Acide orthophosphorique 85% AnalaR NORMAPUR
Expires end of 04/2018

CHARACTERISTICS

SPECIFICATIONS

MEASURED VALUES

We certify that this batch conforms to the specifications listed above.
BDL : Below detected limit.

Isabelle Habay, Head of laboratory - Briare
VWR International
Document printed on 03/2015

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Certificate of Analysis

Product Name: Phosphoric acid
 puriss., meets analytical specification of Ph. Eur., BP, NF,
 FCC, 85.0-88.0 %

Product Number: 04107

Product Brand: Sigma-Aldrich

Molecular Formula: H₃O₄P

Molecular Mass: 98.00

CAS Number: 7664-38-2

TEST	SPECIFICATION	LOT SZBB1170V RESULTS
-------------	----------------------	------------------------------

meets analytical specification of Ph. Eur., BP, NF, FCC

assay	85.0-88.0	85.6 %
volatile acids (CH₃COOH)	≤ 0.001	< 0.001 %
arsenic (As)	≤ 0.0002	< 0.0002 %
cadmium (Cd)	≤ 0.0003	< 0.0003 %
copper (Cu)	≤ 0.001	< 0.001 %
iron (Fe)	≤ 0.001	< 0.001 %
mercury (Hg)	≤ 0.0001	< 0.0001 %
lead (Pb)	≤ 0.0003	< 0.0003 %
zinc (Zn)	≤ 0.001	< 0.001 %
heavy metals (as Pb)	≤ 0.0005	< 0.0005 %
chloride (Cl)	≤ 0.0005	< 0.0005 %
fluoride (F)	≤ 0.0005	< 0.0005 %
nitrate (NO₃)	≤ 0.0005	< 0.0005 %
nitrate (NO₃)	complying	complying
phosphite, hypoph. (H₃PO₃)	≤ 0.003	< 0.003 %
phosphite, hypophosphate	complying	complying
sulfate (SO₄)	≤ 0.005	< 0.005 %
sulfate (SO₄)	complying	complying
appearance of the solution	complying	complying
subst. precipitated by NH₃	complying	complying
alkali phosphates	complying	complying
residual solvents	complying	complying

Identity, assay and impurities are complying to the monographs of the above mentioned pharmacopeias/codices.

Certificate of Analysis

Production Date 27.Apr.11
Rec. Retest Date 03.Oct.15
QC Release Date 04.May.11



Katja Boerner
Quality Management
Seelze, Germany

Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

Certificate of Analysis

Material : 27810.295
Batch : 13G090003

Sodium chlorure AnalAR NORMAPUR ACS, Reag. Ph. Eur.
Expires end of 07/2018

CHARACTERISTICS	SPECIFICATIONS	MEASURED VALUES
Titre	Min. 99,5 %	100,0 %
Aspect de la solution S	Conforme Ph.Eur.	Conforme Ph.Eur.
Identification	Conforme	Conforme
Identification A	Conforme Ph.Eur.	Conforme Ph.Eur.
Identification B	Conforme Ph.Eur.	Conforme Ph.Eur.
NO ₂ (Nitrite)	Conforme Ph.Eur.	Conforme Ph.Eur.
Solution dans l'eau	Conforme	Conforme
Acidité ou alcalinité	Max. 0,0005 meq/g	Max. 0,0005 meq/g
pH (20°C; 5 %)	5,0 --> 8,0	5,5
Métaux lourds (en Pb)	Max. 2 ppm	Max. 2 ppm
Hexacyanoferrates (en Fe(CN) ₆)	Max. 1 ppm	Max. 1 ppm
Insolubilité dans l'eau	Max. 50 ppm	Max. 50 ppm
Perte à la dessiccation	Max. 0,5 %	< 0,1 %
N total (Azote)	Max. 5 ppm	Max. 5 ppm
Br (Bromure)	Max. 50 ppm	Max. 50 ppm
ClO ₃ + NO ₃ (en NO ₃)	Max. 30 ppm	Max. 30 ppm
I (Iodure)	Max. 10 ppm	Max. 10 ppm
PO ₄ (Phosphate)	Max. 5 ppm	Max. 5 ppm
SO ₄ (Sulfate)	Max. 40 ppm	Max. 40 ppm
As (Arsenic)	Max. 0,4 ppm	Max. 0,4 ppm
Ba (Baryum)	Max. 10 ppm	Max. 10 ppm
Ca (Calcium)	Max. 20 ppm	1 ppm
Cu (Cuivre)	Max. 2 ppm	< 1 ppm
Fe (Fer)	Max. 1 ppm	Max. 1 ppm
K (Potassium)	Max. 50 ppm	5 ppm
Mg (Magnésium)	Max. 10 ppm	1 ppm
Ni (Nickel)	Max. 10 ppm	< 1 ppm
Conforme à BDH 10241	Conforme	Conforme

Certificate of Analysis

Material : 27810.295
Batch : 13G090003

Sodium chlorure AnalAR NORMAPUR ACS, Reag. Ph. Eur.
Expires end of 07/2018

CHARACTERISTICS

SPECIFICATIONS

MEASURED VALUES

We certify that this batch conforms to the specifications listed above.
BDL : Below detected limit.

Wendy Mathues, Head of laboratory - Haasrode
VWR International
Document printed on 03/2015

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Certificate of Analysis

Product Name: SODIUM 1-HEPTANESULFONATE MONOHYDRATE
for ion pair chromatography

Product Number: 51832

Batch Number: BCBP7095V

Brand: Fluka

CAS Number: 207300-90-1

Formula: CH₃(CH₂)₅CH₂SO₃Na • H₂O

Formula Weight: 220.26

Quality Release Date: 27 MAR 2015

Recommended Retest Date: AUG 2018

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS OR WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	CRYSTALS OR FLAKES	FLAKES
TITRATION (ION EXCHANGE)	≥ 99.0 %	99.8 %
SUITABILITY TEST (HPLC)	CORRESPONDS TO STANDARD	CORRESPONDS TO STANDARD
WATER	8.18 % (THEORY FOR MONOHYDRATE)	5.10 %
CARBON CONTENT	38.17 % (THEORY)	38.10 %
HYDROGEN CONTENT	7.78 % (THEORY)	7.56 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
TEST BY UV SPECTROSCOPY	210NM ≤ 0.1 220NM ≤ 0.06 230NM ≤ 0.04 260NM ≤ 0.02 500NM ≤ 0.02	210NM: 0.10 220NM: 0.01 230NM: 0.01 260NM: <0.005 500NM: <0.005
CYCLIC VOLTAMMOGRAM	CORRESPONDS TO STANDARD CV	CORRESPONDS
RESIDUE (FILTER TEST)	NO RESIDUE	NO RESIDUE
FILTERTEST (METHOD)	1 G IN 10 ML H ₂ O	--



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

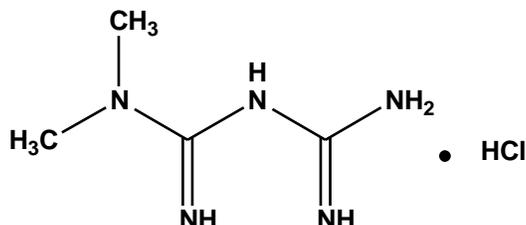
Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Certificate of Analysis

ISO GUIDE 34
ACCLASS Cert# AR-1470

ISO/IEC 17025
ACCLASS Cert# AT-1467

METFORMIN HYDROCHLORIDE CERTIFIED REFERENCE MATERIAL



CERTIFIED PURITY: 99.9%, $U_{\text{crm}} = \pm 0.06\%$ $k = 2$
(Mass Balance/as is basis)

NOMINAL PACKAGE SIZE: 500mg

CATALOG #: PHR1084

LOT #: P500240

CERTIFICATE VERSION: 500240.2

ISSUE DATE: 31 January 2014

Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot changes or the availability of new data.

Check our website at: www.sigma-aldrich.com for the most current version.

CRM EXPIRATION: 12 Months from Receipt (Proper Storage and Handling Required).

RECEIPT DATE: _____

Note: this space is provided for convenience only and its use is not required.

STORAGE: Store in a Refrigerator, keep container tightly closed. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

CHEMICAL FORMULA: C₄H₁₂N₅

MW: 165.6

PHYSICAL DESCRIPTION: White powder in amber vial

CAS #: 1115-70-4

HAZARDS: Read Safety Data Sheet before using. All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel.

INSTRUCTIONS FOR USE: Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. This material is intended for R&D use only. Not for drug, household or other uses.

TRACEABILITY ASSAY

Comparative assay demonstrates direct traceability to Pharmacopeial Standards
Specification: 98.5 to 101.0% (USP)

ASSAY vs. USP REFERENCE STANDARD (as is basis)

ASSAY VALUE

100.4%

vs. USP LOT

J0L465

Labeled Content = 0.998mg/mg

METHOD: HPLC (ref.: Glyburide and Metformin Hydrochloride Tablets; USP36)

Column: Ascentis C18, 4.6 x 250mm, 5µm

Mobile Phase: 0.5g/L Sodium-1-heptanesulfonate and 0.5g/L NaCl in Water, Acetonitrile (90:10)

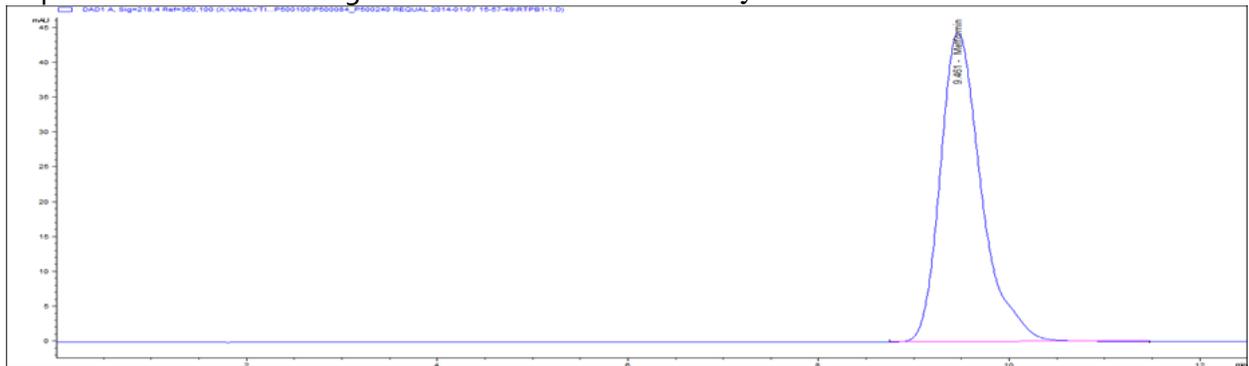
Flow: 1mL/min

Column Temperature: 30°C

Injection: 3.5µl

Detector: 218nm

Representative Chromatogram from Lot: P500240 Analysis



ASSAY vs. EP CRS (as is basis)

<u>ASSAY VALUE</u>	<u>vs. EP BATCH</u>
100.1%	3.1 Labeled Content = None Assigned Content = 99.5%*

ASSAY vs. BP CRS (as is basis)

<u>ASSAY VALUE</u>	<u>vs. BP BATCH</u>
100.4%	3267 Labeled Content = 99.8%

*The assigned content of the EP CRS was determined by assay against the USP Reference Standard and the BP CRS

METHOD: UV (ref.: Metformin Hydrochloride Tablets, USP34)

Solvent: Water

Cell Pathlength: 1cm

Wavelength: 232nm

PURITY DETERMINATION BY MASS BALANCE

CHROMATOGRAPHIC IMPURITY ANALYSIS

METHOD: HPLC (ref.: Metformin Hydrochloride; USP34)

Column: Supelcosil LC- SCX, 4.6 x 250mm, 5µm

Mobile Phase: Monobasic ammonium phosphate in water, pH 3.0 with phosphoric acid

Flow: 1mL/min

Column Temperature: 30°C

Injection: 20µl

Detector: 218nm

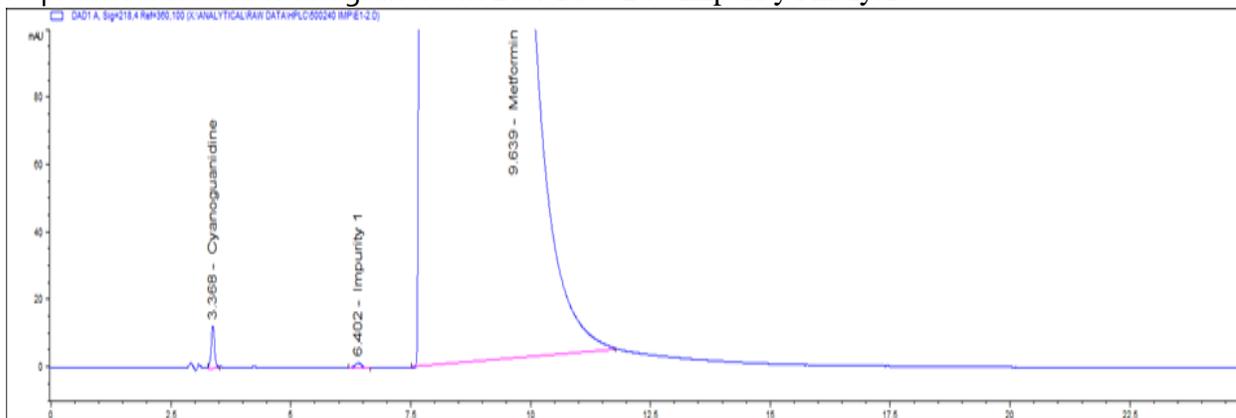
Impurities Detected

1-Cyanoguanidine: 0.003%

Impurity 1: 0.006%

Total Impurities: **0.009%**

Representative Chromatogram from Lot: P500240 Impurity Analysis



RESIDUAL SOLVENTS

Method: GC-MS Headspace (ref.: Residual Solvents <467>, USP34)

Column: DB-1301

Carrier gas: He

Flow: 1.2mL/min

Split Ratio: 1:5

Injection/Temperature: 1µl/250°C

Temperature Program: 40°C for 20min, 10°C/min to 240°C, hold 20min

Solvents Detected: None

LOSS ON DRYING/VOLATILES

Method: 105°C

Mean of three samples, Loss = **0.06%**

RESIDUE ANALYSIS

Method: Sulfated Ash

Sample Size: ~1g

Mean of three determinations, Residue = **0.01%**

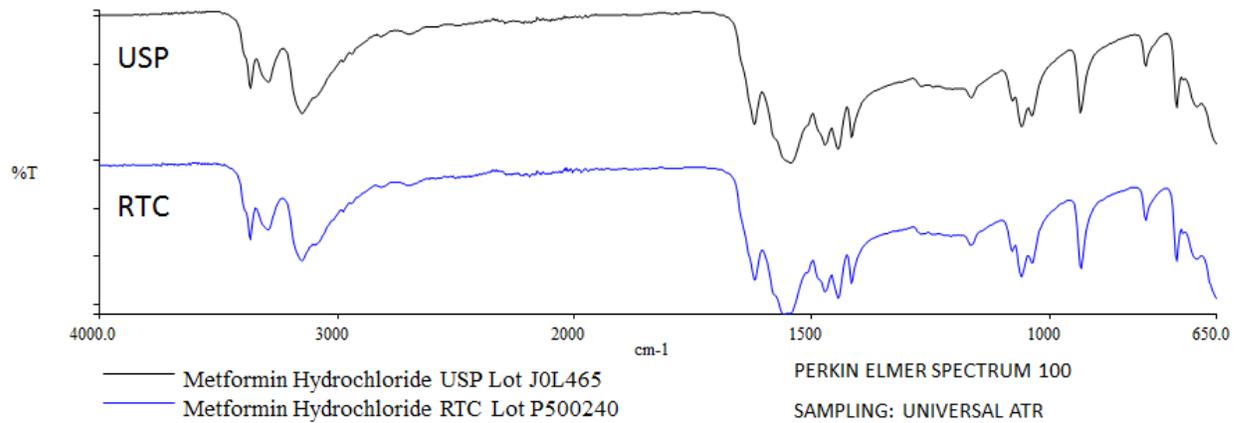
CERTIFIED PURITY BY MASS BALANCE [100% - Impurities (normalized)]

99.9% $U_{\text{CRM}} = \pm 0.06\%$, $k = 2$
(as is basis)

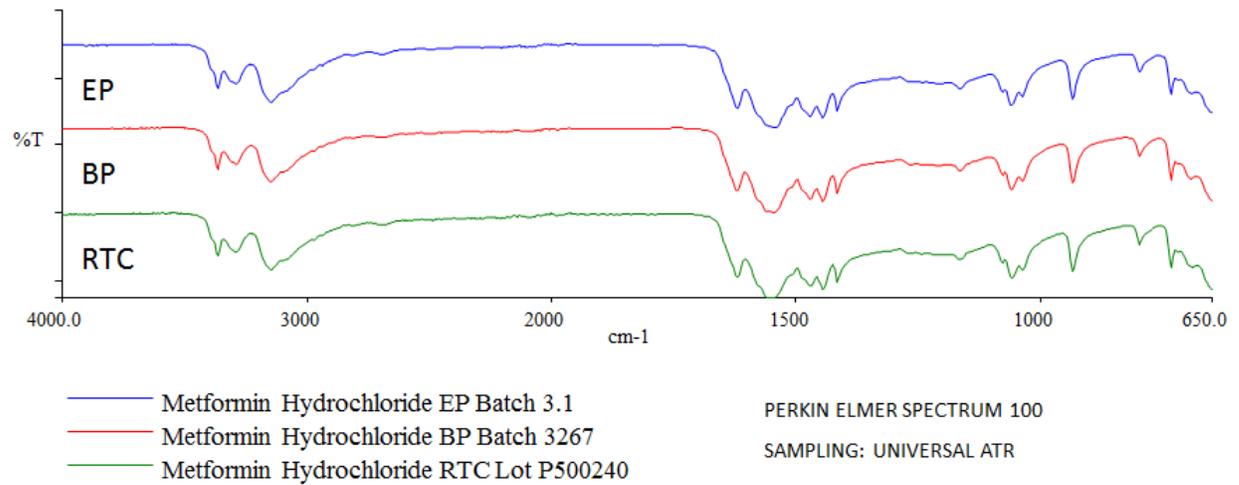
IDENTIFICATION TESTS

INFRARED SPECTROPHOTOMETRY (Comparative identification analysis demonstrates direct traceability to Pharmacopeial standards)

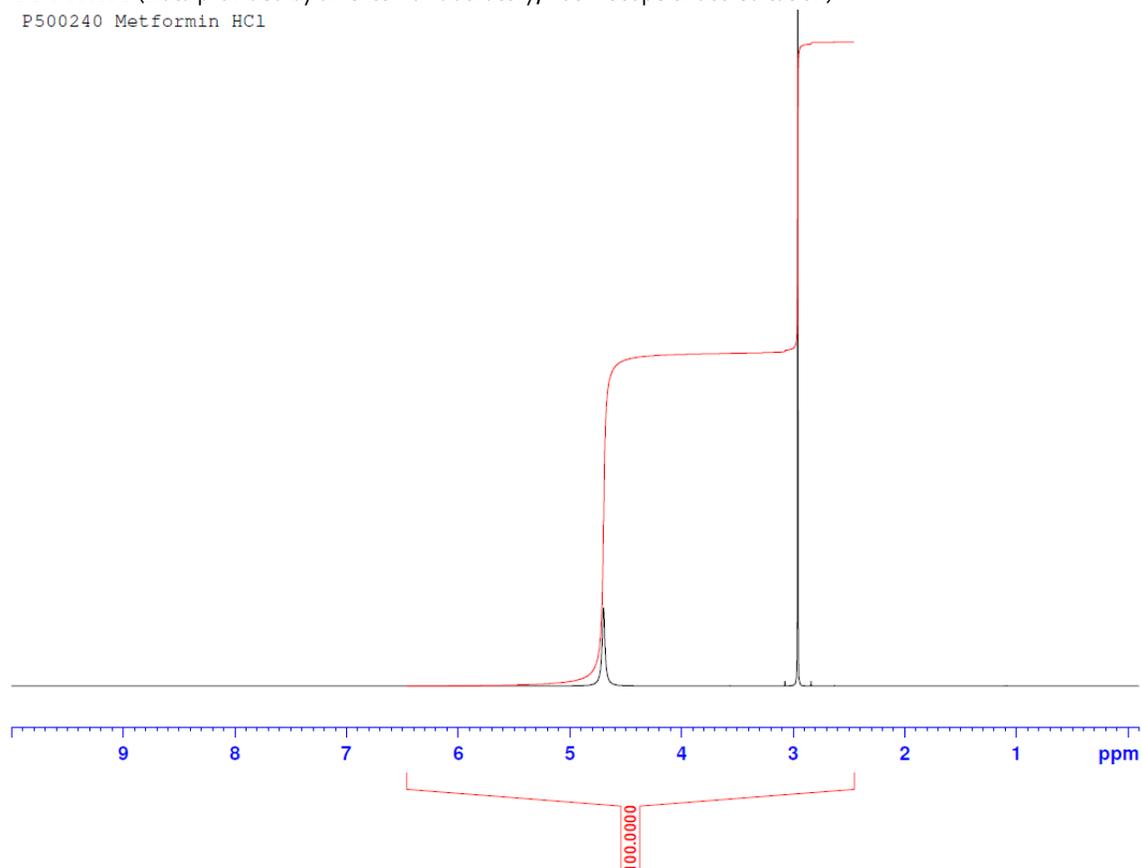
FTIR Comparison of Metformin Hydrochloride



FTIR Comparison of Metformin Hydrochloride



¹H NMR (Data provided by an external laboratory; not in scope of accreditation)
 P500240 Metformin HCl



Consistent with structure

ELEMENTAL ANALYSIS (Data provided by an external laboratory; not in scope of accreditation)

Exeter Analytical 440 Elemental Analyzer

Combustion method

%	Theoretical	Result 1	Result 2	Mean
C	29.00	28.95	28.92	28.94
H	7.30	7.16	7.18	7.17
N	42.28	41.47	41.45	41.46

MELTING RANGE

Specification: 222°C to 226°C (EP)

Mettler Toledo FP900 Thermosystem with FP81 Measuring Cell

Mean of three measurements = **224.7° – 226.1°C**

HOMOGENEITY ASSESSMENT

Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA). The uncertainty due to homogeneity was derived from the ANOVA. Heterogeneity was not detected under the conditions of the ANOVA.

Analytical Method: UV-Vis

Sample size: ~50mg

UNCERTAINTY STATEMENT

Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (U_{crm}) corresponding to the 95% confidence interval. U_{crm} is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k , which is obtained from a t -distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

STABILITY ASSESSMENT

Significance of the stability assessment will be demonstrated if the analytical result of the study and the range of values represented by the Expanded Uncertainty do not overlap the result of the original assay and the range of its values represented by the Expanded Uncertainty. The method employed will usually be the same method used to characterize the assay value in the initial evaluation.

Long Term Stability Evaluation - An assessment, or re-test, versus a Compendial Reference Standard may be scheduled, within the 3 year anniversary date of a release of a Secondary Standard. The re-test interval will be determined on a case-by-case basis.

Short Term Stability Study - It is useful to assess stability under reasonably anticipated, short term transport conditions by simulating exposure of the product to humidity and temperature stress. This type of study is conducted under controlled conditions of elevated temperature and humidity.



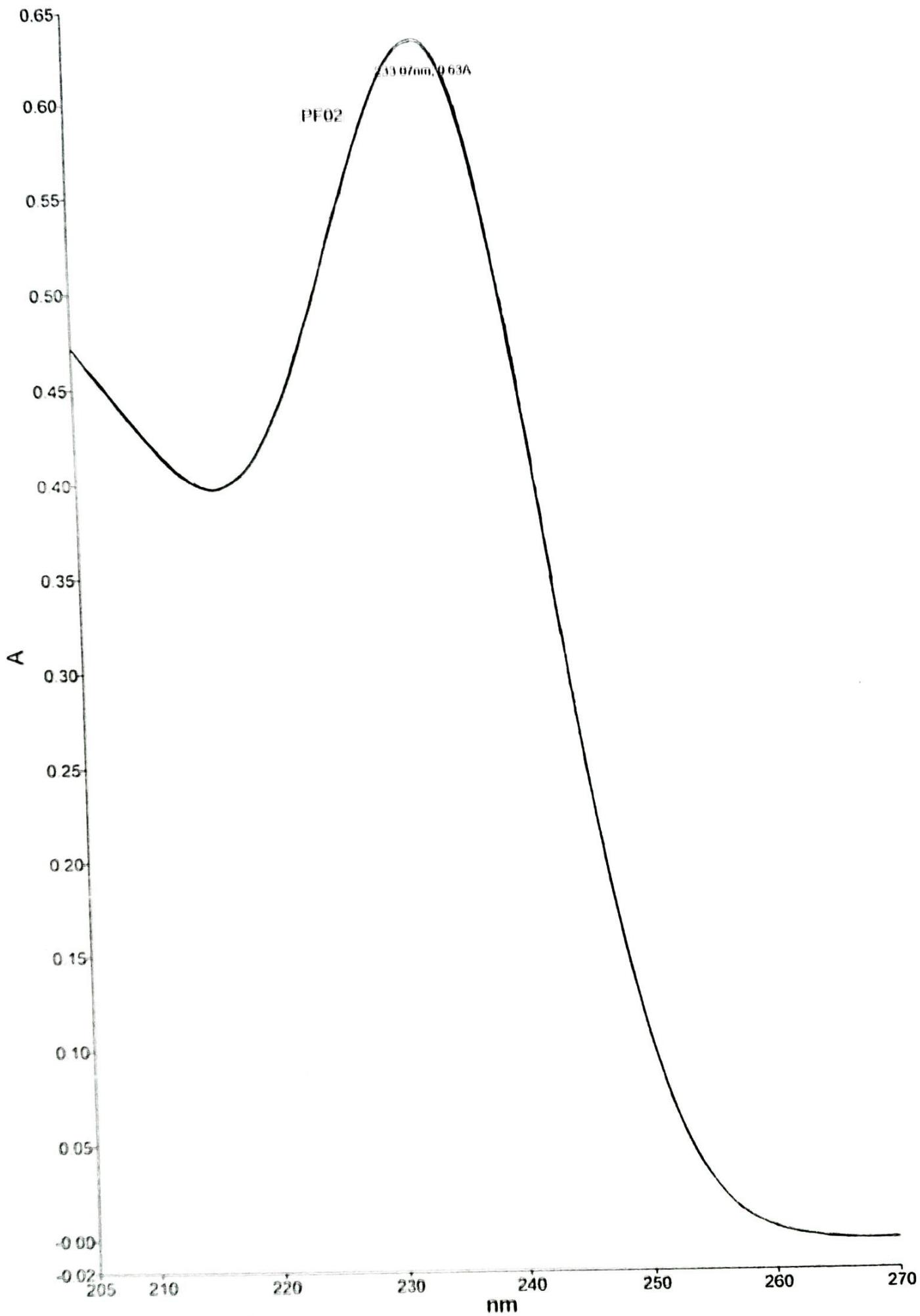
Operations Manager



QA Supervisor

APPENDIX

Original Release Date: 01 August 2012
Stability Test Date: 06 January 2014
Requalification Test Date: 06 January 2014



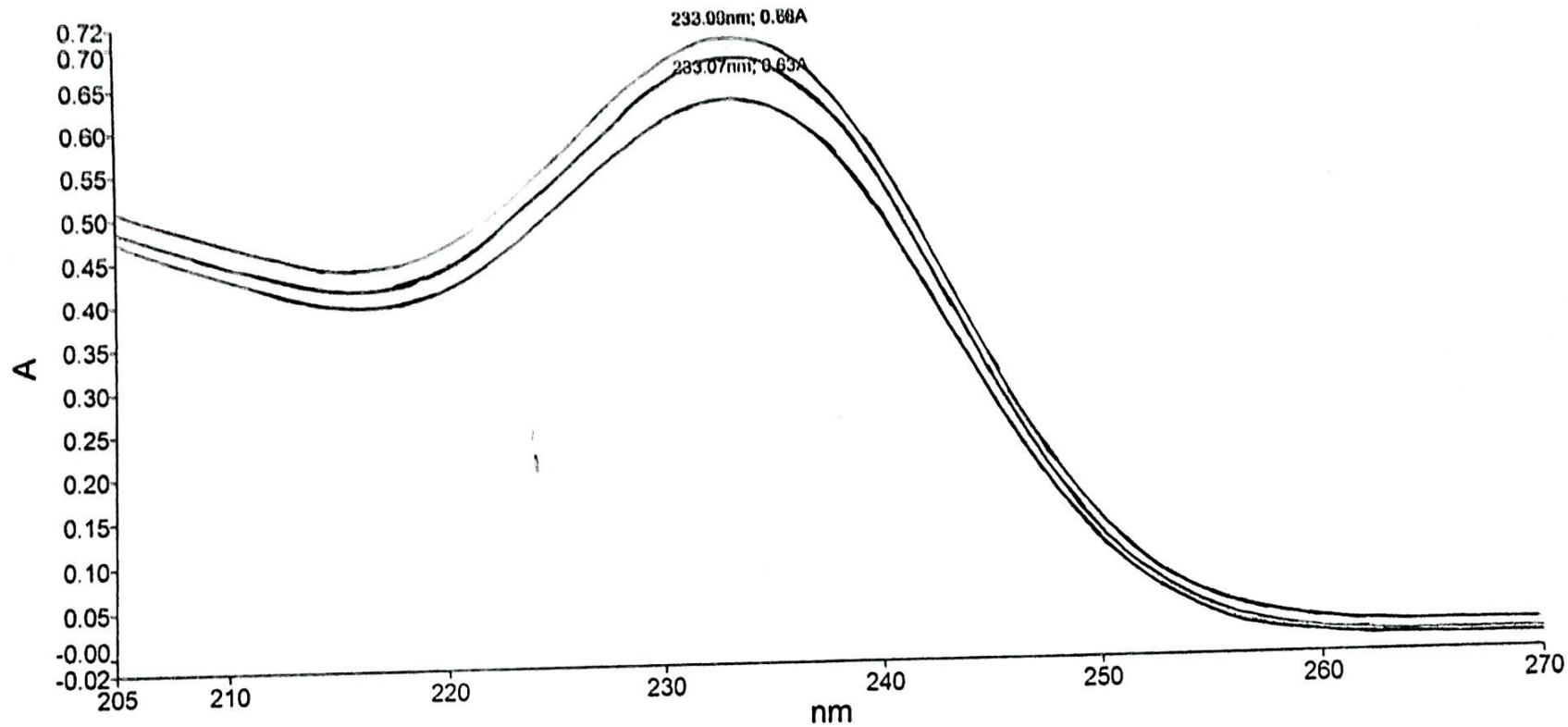
PF02

230.07nm, 0.63A

Nom Description
PF02 Sample

Analyst
Date

Administrator
mardi 20 mars 2018 14:55

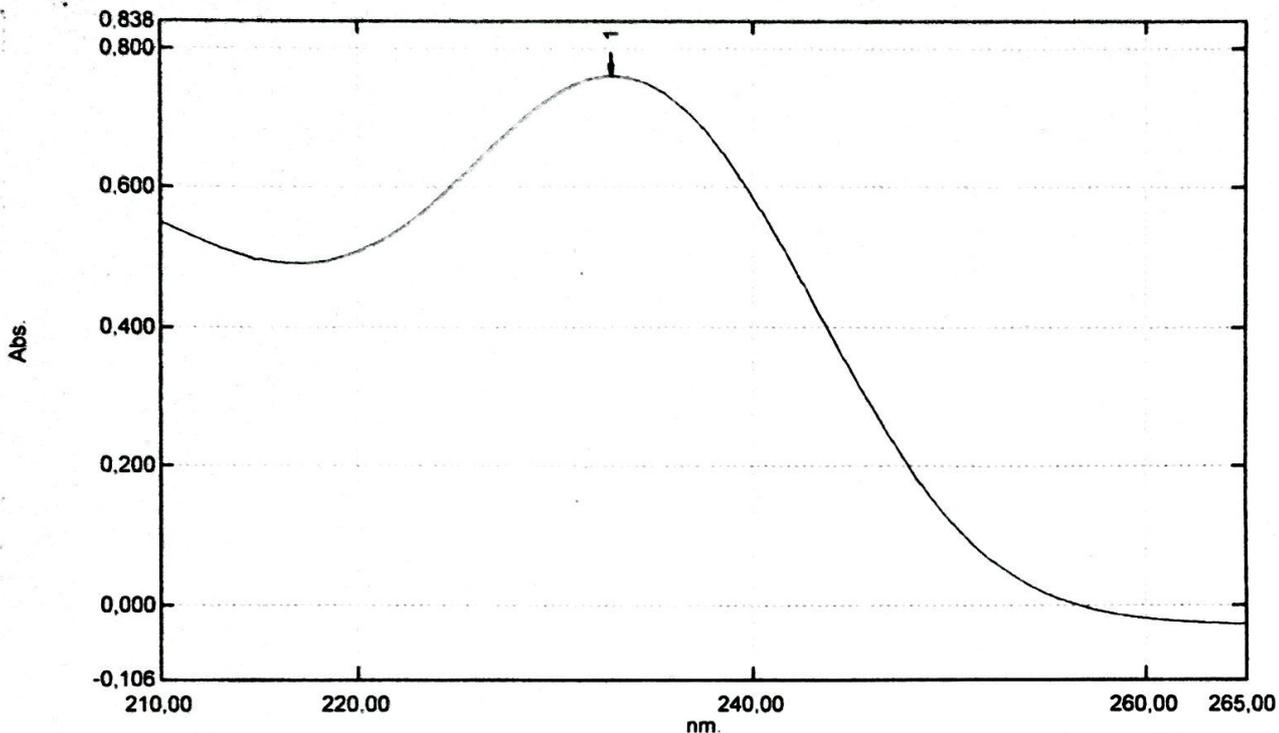


— MP.Sample
— PF01.Sample
— PF02.Sample

Spectrum Peak Pick Report

02/04/2018 12:16:46

Data Set: e18020_121307 - RawData *cp 500*



[Measurement Properties]
Wavelength Range (nm.): 210,00 to 265,00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0,05
Auto Sampling Interval: Enabled
Scan Mode: Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	①	232,85	0,759	

[Instrument Properties]
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1,0 nm
Light Source Change Wavelength: 340,0 nm
S/R Exchange: Normal

[Attachment Properties]
Attachment: None

[Operation]
Threshold: 0,0010000
Points: 4
InterPolate: Disabled
Average: Disabled

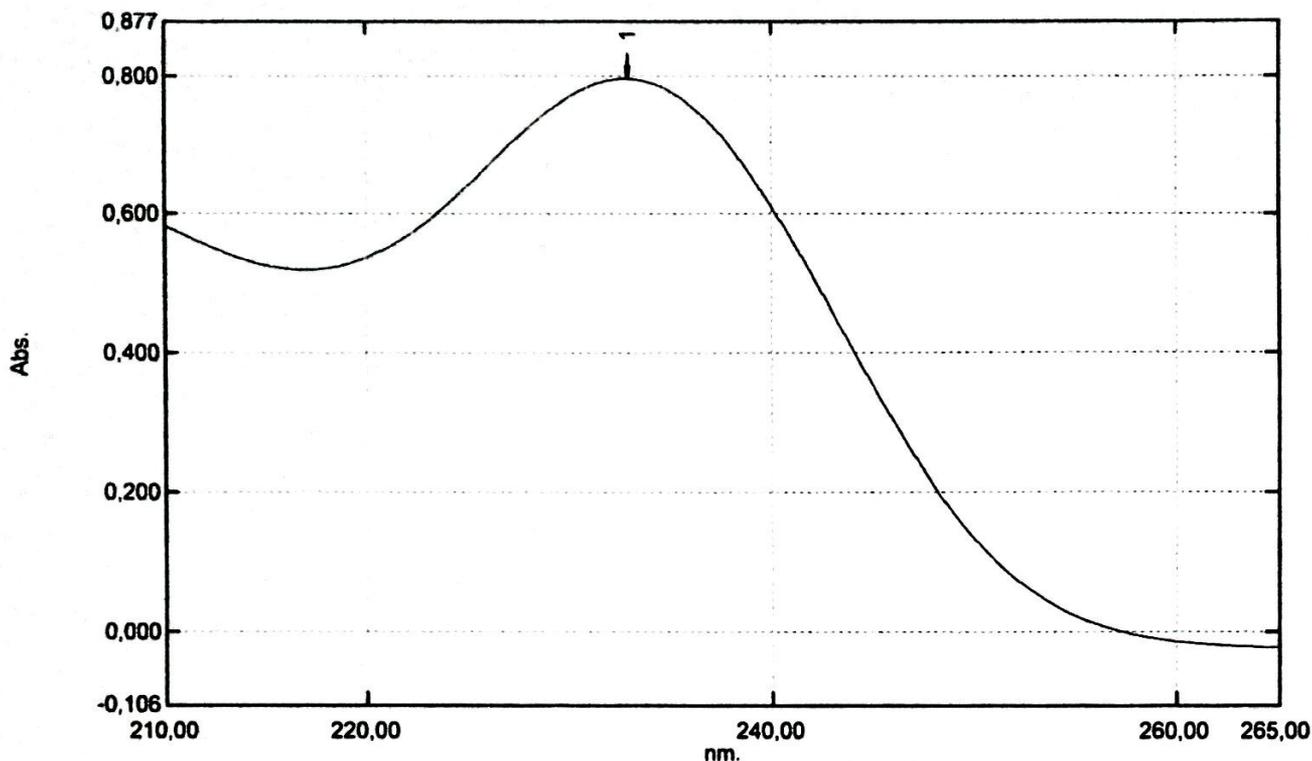
[Sample Preparation Properties]
Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

Spectrum Peak Pick Report

02/04/2018 12:26:15

Data Set: e18021_122254 - RawData

CP500



[Measurement Properties]
 Wavelength Range (nm.): 210,00 to 265,00
 Scan Speed: Medium
 Sampling Interval: 0,05
 Auto Sampling Interval: Enabled
 Scan Mode: Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	Ⓢ	232,90	0,795	

[Instrument Properties]
 Instrument Type: UV-1800 Series
 Measuring Mode: Absorbance
 Slit Width: 1,0 nm
 Light Source Change Wavelength: 340,0 nm
 S/R Exchange: Normal

[Attachment Properties]
 Attachment: None

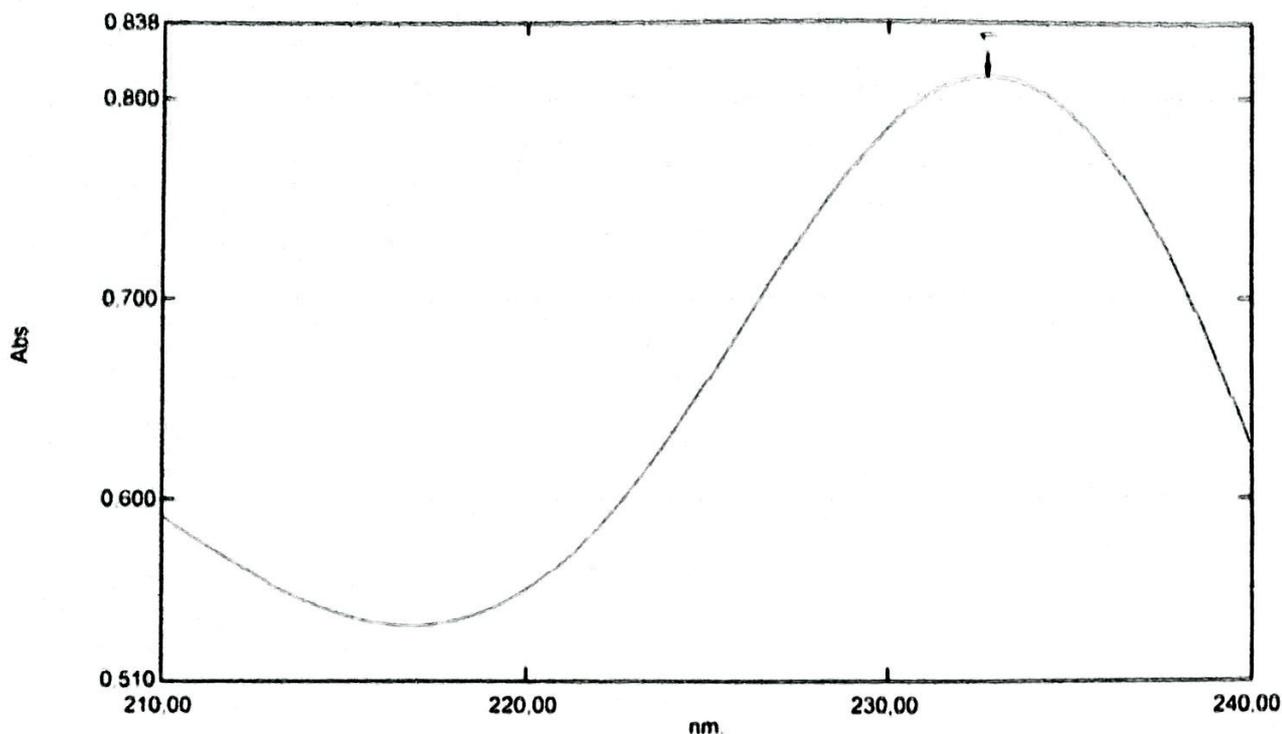
[Operation]
 Threshold: 0,0010000
 Points: 4
 InterPolate: Disabled
 Average: Disabled

[Sample Preparation Properties]
 Weight:
 Volume:
 Dilution:
 Path Length:
 Additional Information:

Spectrum Peak Pick Report

07/03/2018 14:37:13

Data Set: 18013_143257 - RawData



[Measurement Properties]
 Wavelength Range (nm) 210.00 to 240.00
 Scan Speed Medium
 Sampling Interval 0.05
 Auto Sampling Interval Enabled
 Scan Mode Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⊕	232.70	0.811	

[Instrument Properties]
 Instrument Type UV-1800 Series
 Measuring Mode Absorbance
 Slit Width 1.0 nm
 Light Source Change Wavelength 340.0 nm
 S/R Exchange Normal

[Attachment Properties]
 Attachment None

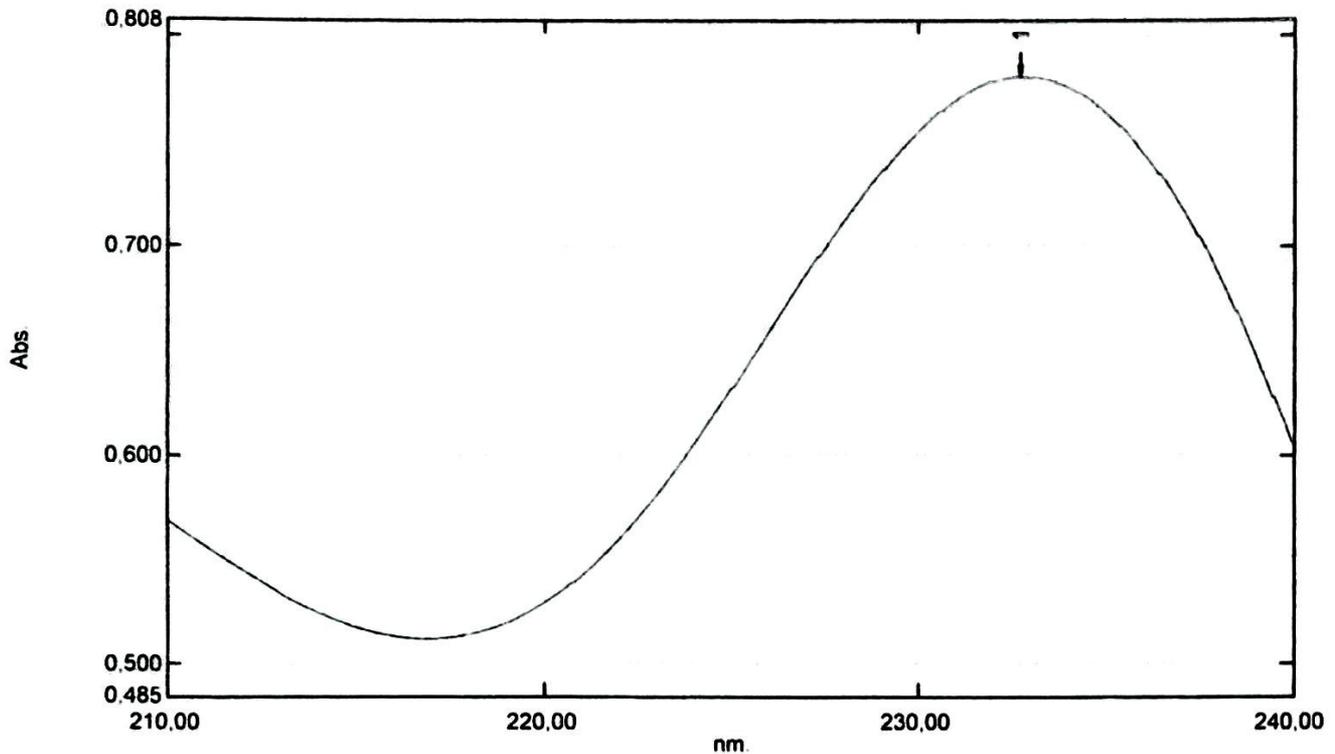
[Operation]
 Threshold 0.0010000
 Points 4
 InterPolate Disabled
 Average Disabled

[Sample Preparation Properties]
 Weight
 Volume
 Dilution
 Path Length
 Additional Information

Spectrum Peak Pick Report

07/03/2018 14:41:26

Data Set: 18013_143848 - RawData



[Measurement Properties]
Wavelength Range (nm.): 210.00 to 240.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.05
Auto Sampling Interval: Enabled
Scan Mode: Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	Ⓢ	232.70	0.781	

[Instrument Properties]
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.0 nm
S/R Exchange: Normal

[Attachment Properties]
Attachment: None

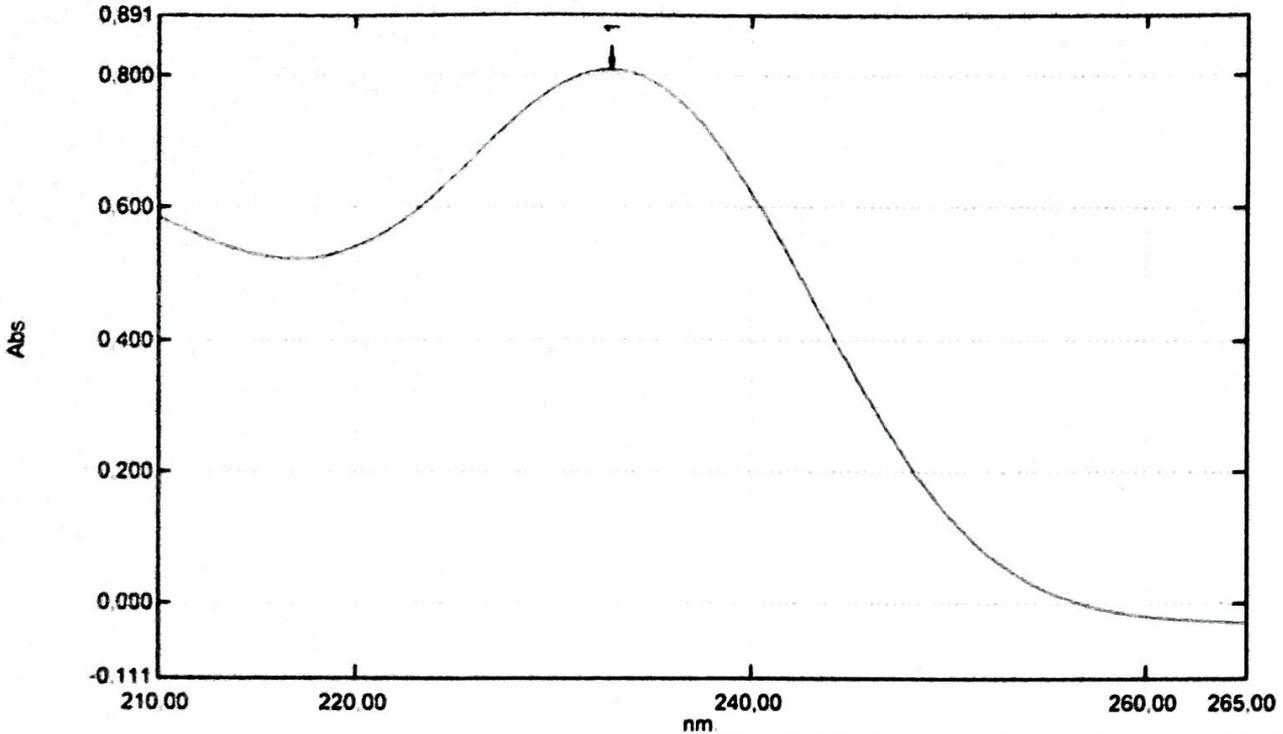
[Operation]
Threshold: 0.0010000
Points: 4
InterPolate: Disabled
Average: Disabled

[Sample Preparation Properties]
Weight
Volume
Dilution
Path Length
Additional Information

Spectrum Peak Pick Report

02/04/2018 12:10:28

Data Set: e18013_120518 - RawData *up 1000*



[Measurement Properties]
 Wavelength Range (nm) 210.00 to 265.00
 Scan Speed Medium
 Sampling Interval 0.05
 Auto Sampling Interval Enabled
 Scan Mode Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	Ⓢ	232.95	0.808	

[Instrument Properties]
 Instrument Type UV-1800 Series
 Measuring Mode Absorbance
 Slit Width 1.0 nm
 Light Source Change Wavelength 340.0 nm
 S/R Exchange Normal

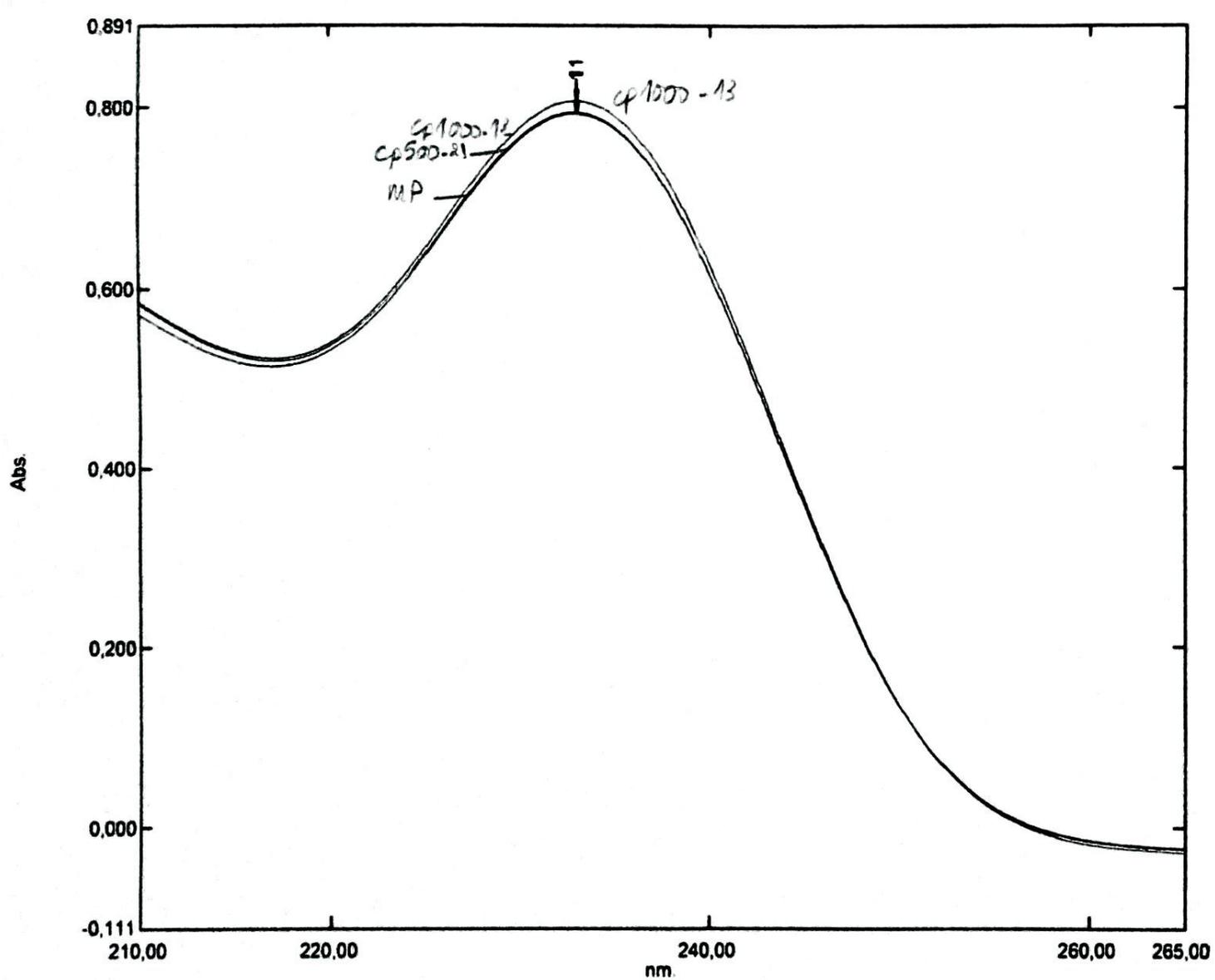
[Attachment Properties]
 Attachment None

[Operation]
 Threshold 0.0010000
 Points 4
 Interpolate Disabled
 Average Disabled

[Sample Preparation Properties]
 Weight
 Volume
 Dilution
 Path Length
 Additional Information

Overlay Spectrum Graph Report

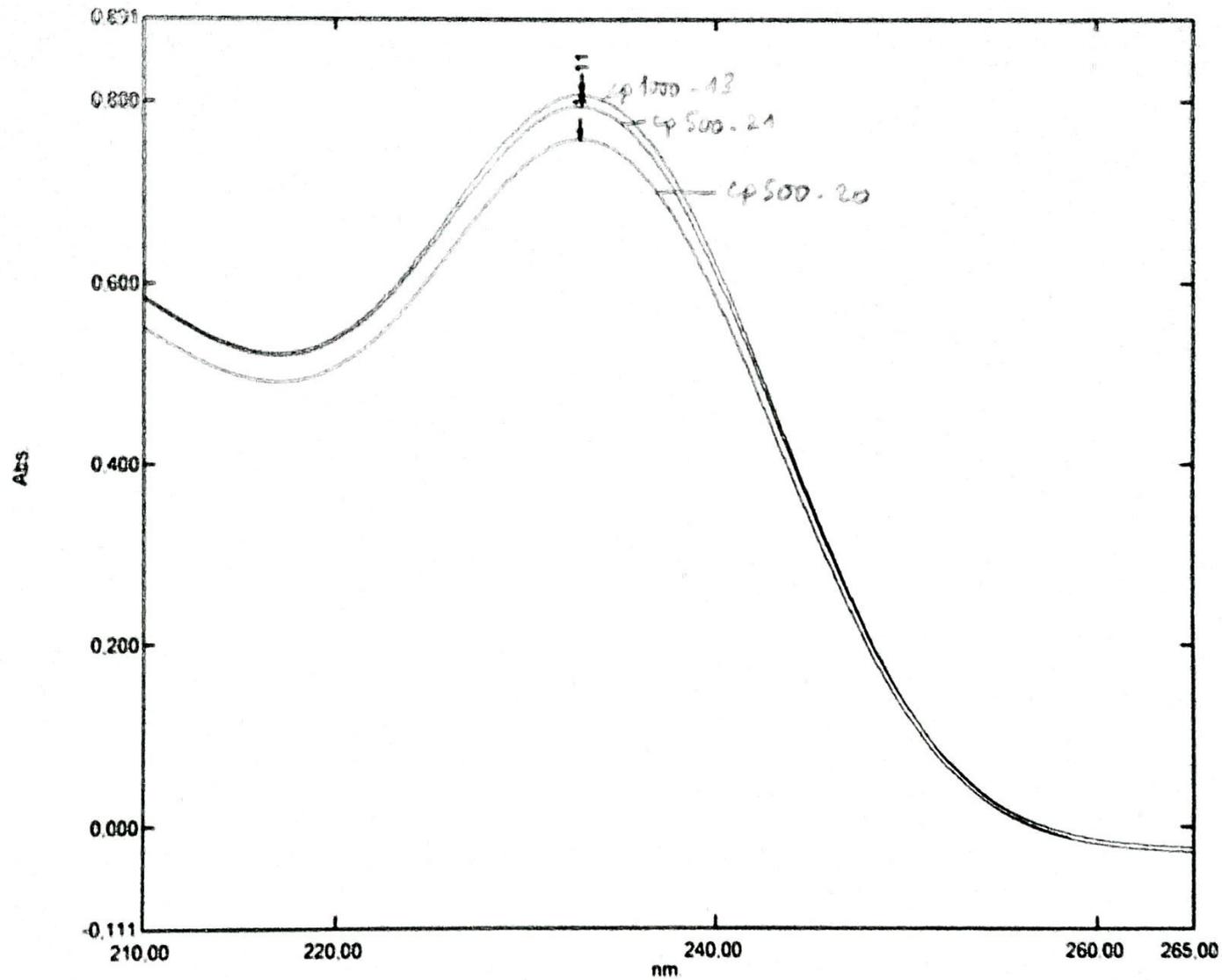
02/04/2018 12:32:19



e18013_120518 - RawDa
e18021_122254 - RawDa
MP2_122918 - RawData

Overlay Spectrum Graph Report

02/04/2018 12:26:00

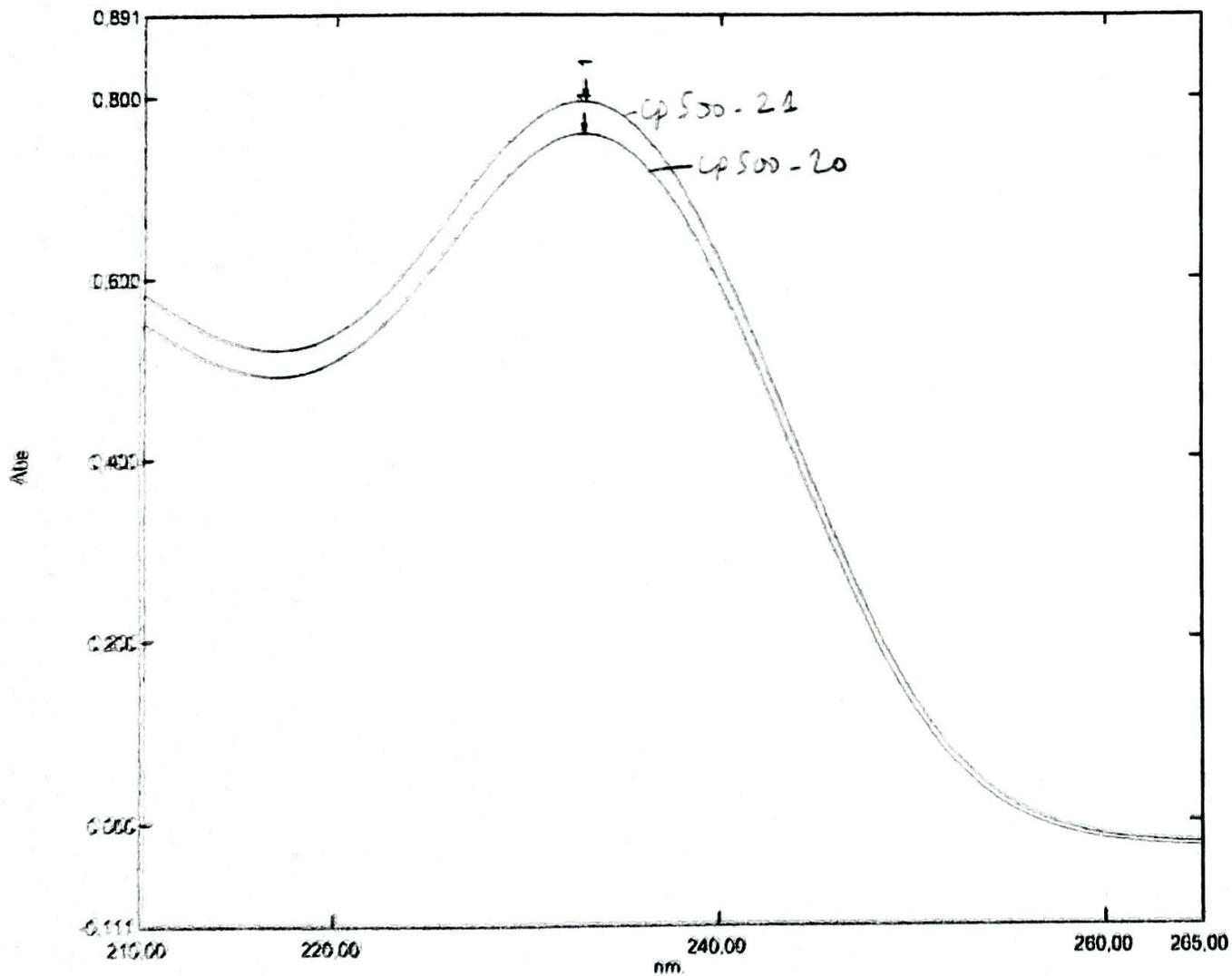


e18013_120518 - RawDa
e18020_121307 - RawDa
e18020_122207 - RawDa
e18021_122254 - RawDa

Overlay Spectrum Graph Report

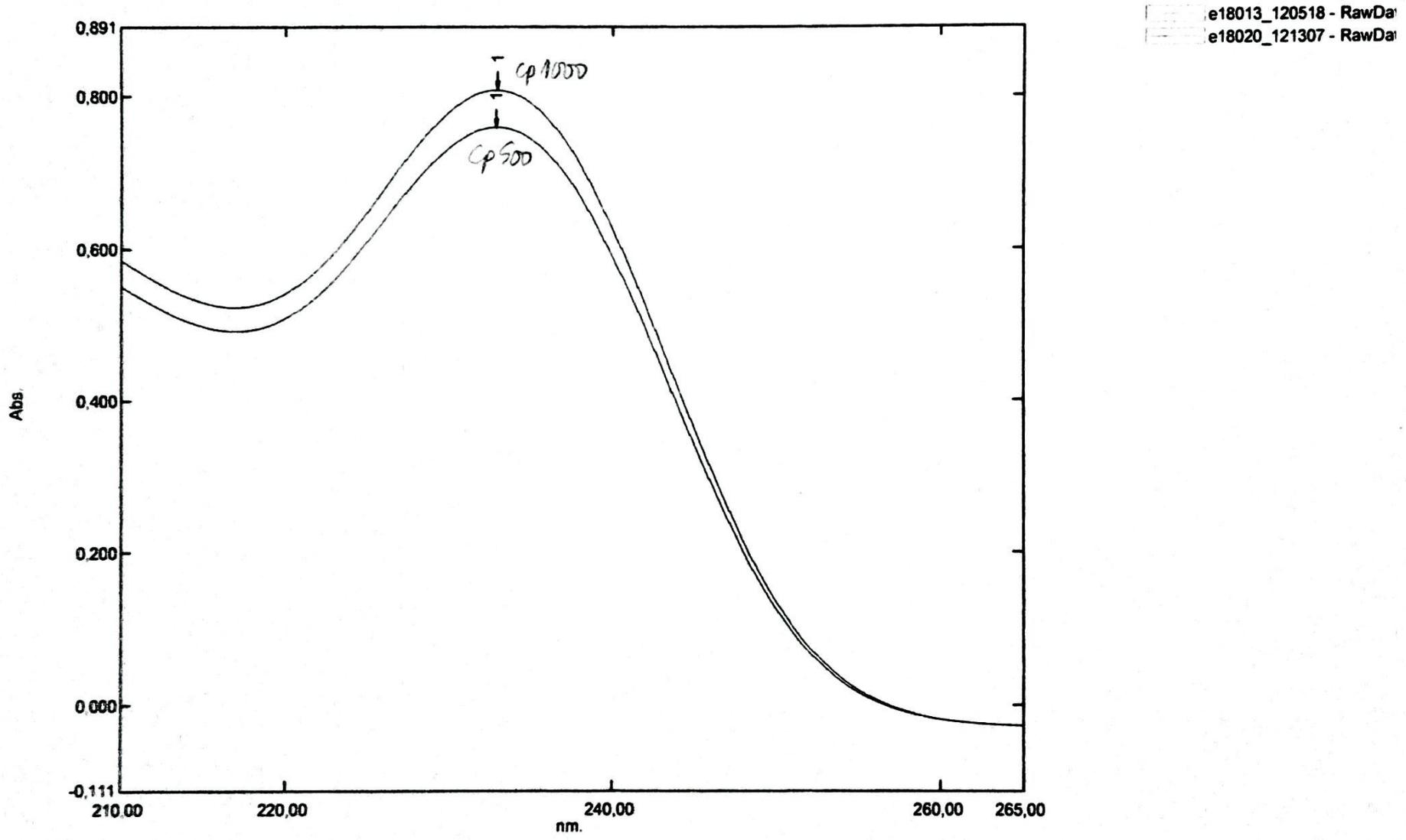
02/04/2018 12:27:19

e18020_121307 - RawDa
e18021_122254 - RawDa



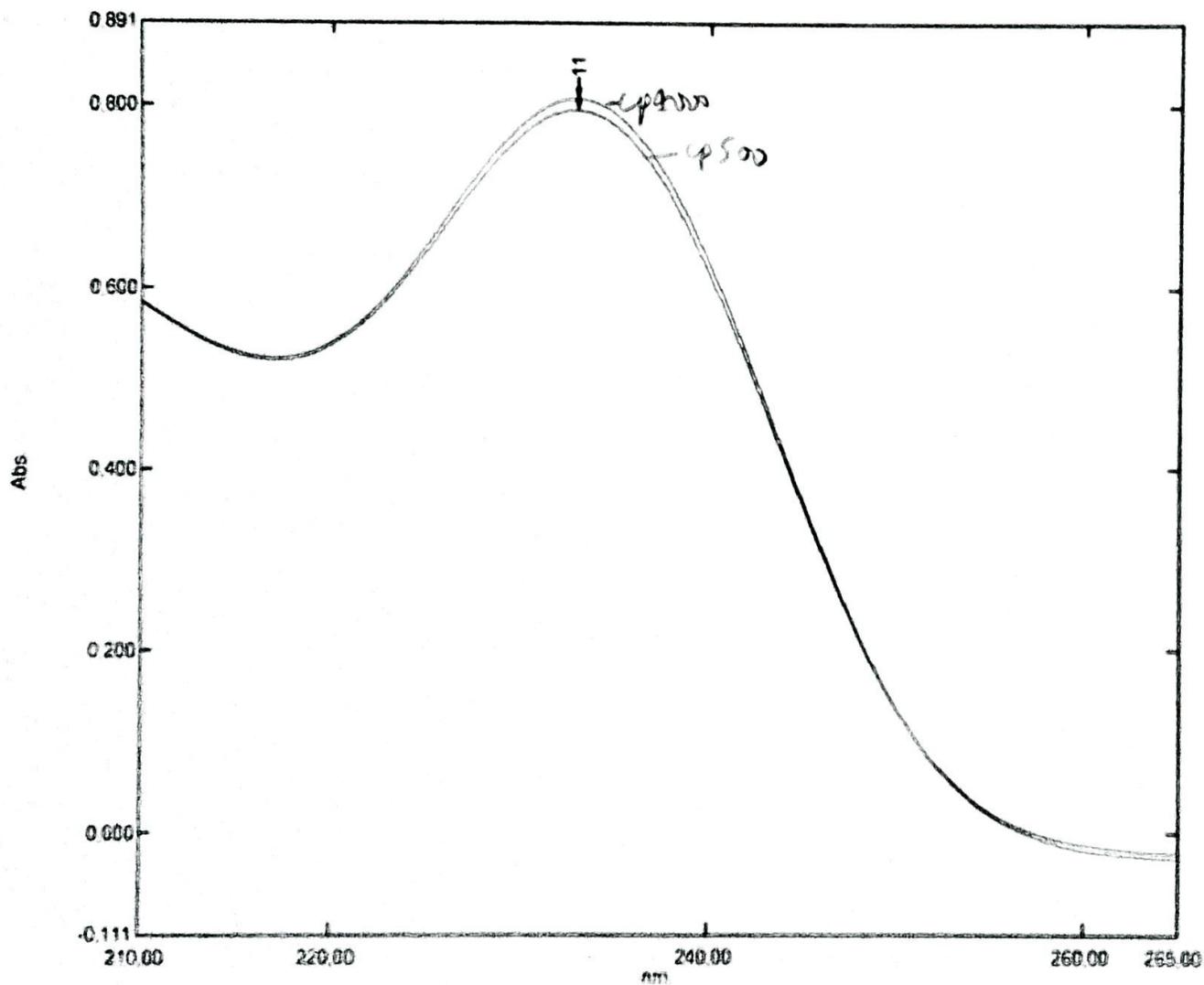
Overlay Spectrum Graph Report

02/04/2018 12:20:37

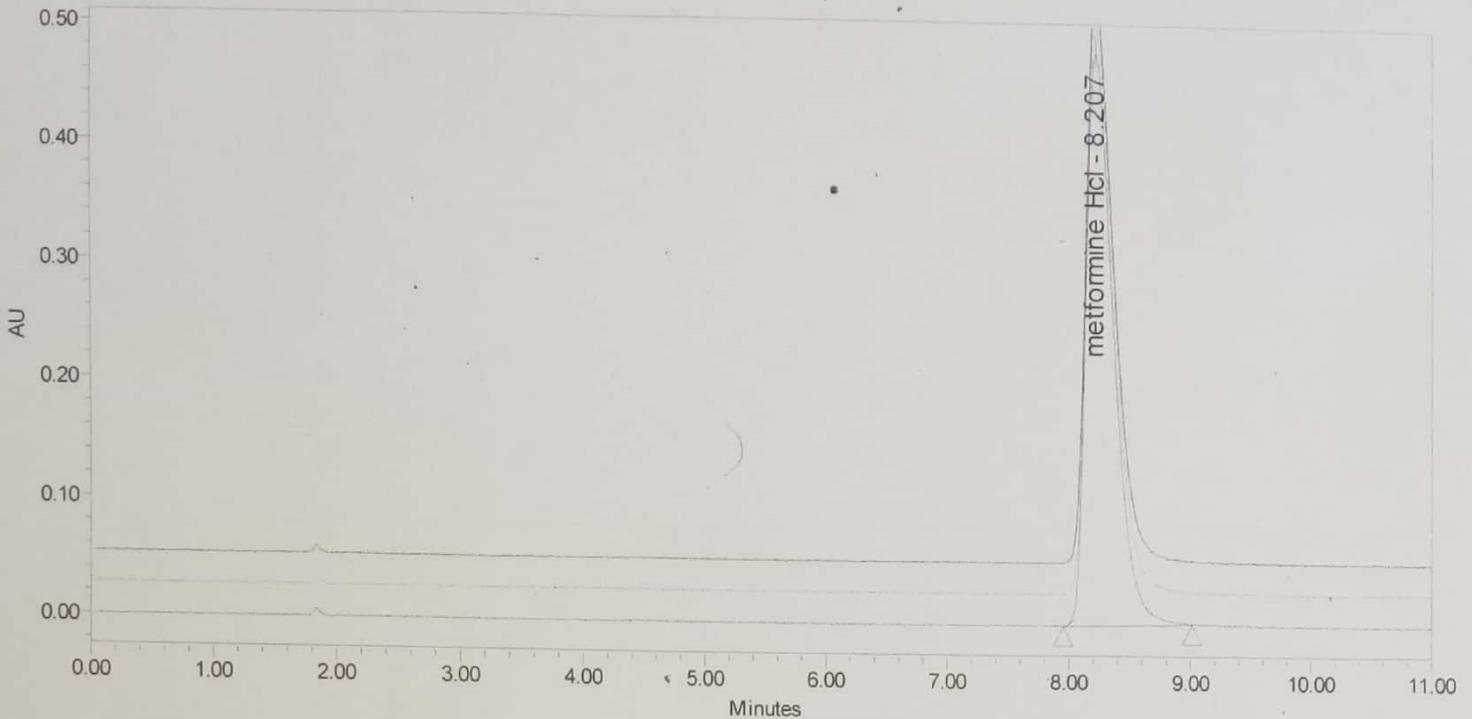


Overlay Spectrum Graph Report

02/04/2018 12:26:46



e18013_120518 - RowDa
e18020_122207 - RowDa
e18021_122254 - RowDa

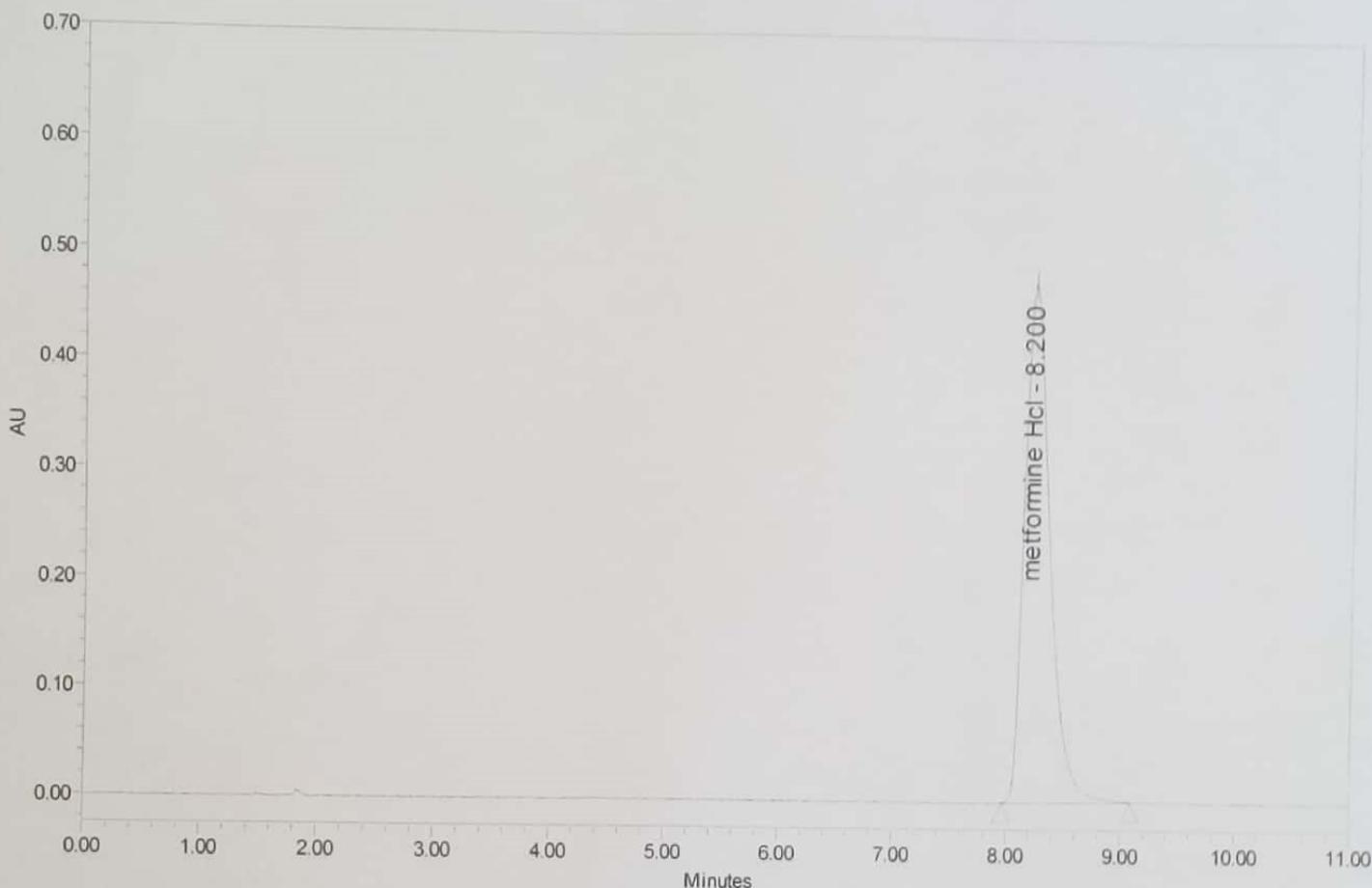


— Sample Name: PF 1000-51; Date Acquired: 5/22/2018 3:16:02 PM CET; Vial: 90; Injection: 1
 — Sample Name: PF 1000-51; Date Acquired: 5/22/2018 3:27:42 PM CET; Vial: 90; Injection: 2
 — Sample Name: PF 1000-51; Date Acquired: 5/22/2018 3:39:20 PM CET; Vial: 90; Injection: 3
 — Sample Name: PF 1000-51; Date Acquired: 5/22/2018 3:51:00 PM CET; Vial: 90; Injection: 4

Peak Summary with Statistics

Name: metformine Hcl

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	USP Tailing	USP Plate Count
1	PF 1000-51	90	1	metformine Hcl	8.207	7531239	100.00	484649	101.1	1.779041e+000	6.373806e+003
2	PF 1000-51	90	4	metformine Hcl	8.212	7488646	100.00	478568	100.5	1.670169e+000	6.333005e+003
3	PF 1000-51	90	3	metformine Hcl	8.208	7504944	100.00	481816	100.8	1.691796e+000	6.275047e+003
4	PF 1000-51	90	2	metformine Hcl	8.210	7513864	100.00	482293	100.9	1.725652e+000	6.320394e+003
Mean					8.209				100.8		
Std. Dev.					0.002						
% RSD					0.03				0.2		



Sample Name: PF 1000-50; Date Acquired: 5/22/2018 2:29:23 PM CET; Vial: 89; Injection: 1

Peak Summary with Statistics
Name: metformine Hcl

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	USP Tailing	USP Plate Count
1	PF 1000-50	89	1	metformine Hcl	8.200	7305419	100.00	476320	100.1	1.862820e+000	6.544566e+003
Mean					8.200				100.1		
Std. Dev.											
% RSD											

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\STD-1..PRM
Origin : Acquired
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ
File Created : 04/06/2018 09:43:44
Acquired Date : 04/06/2018 09:43:44
By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

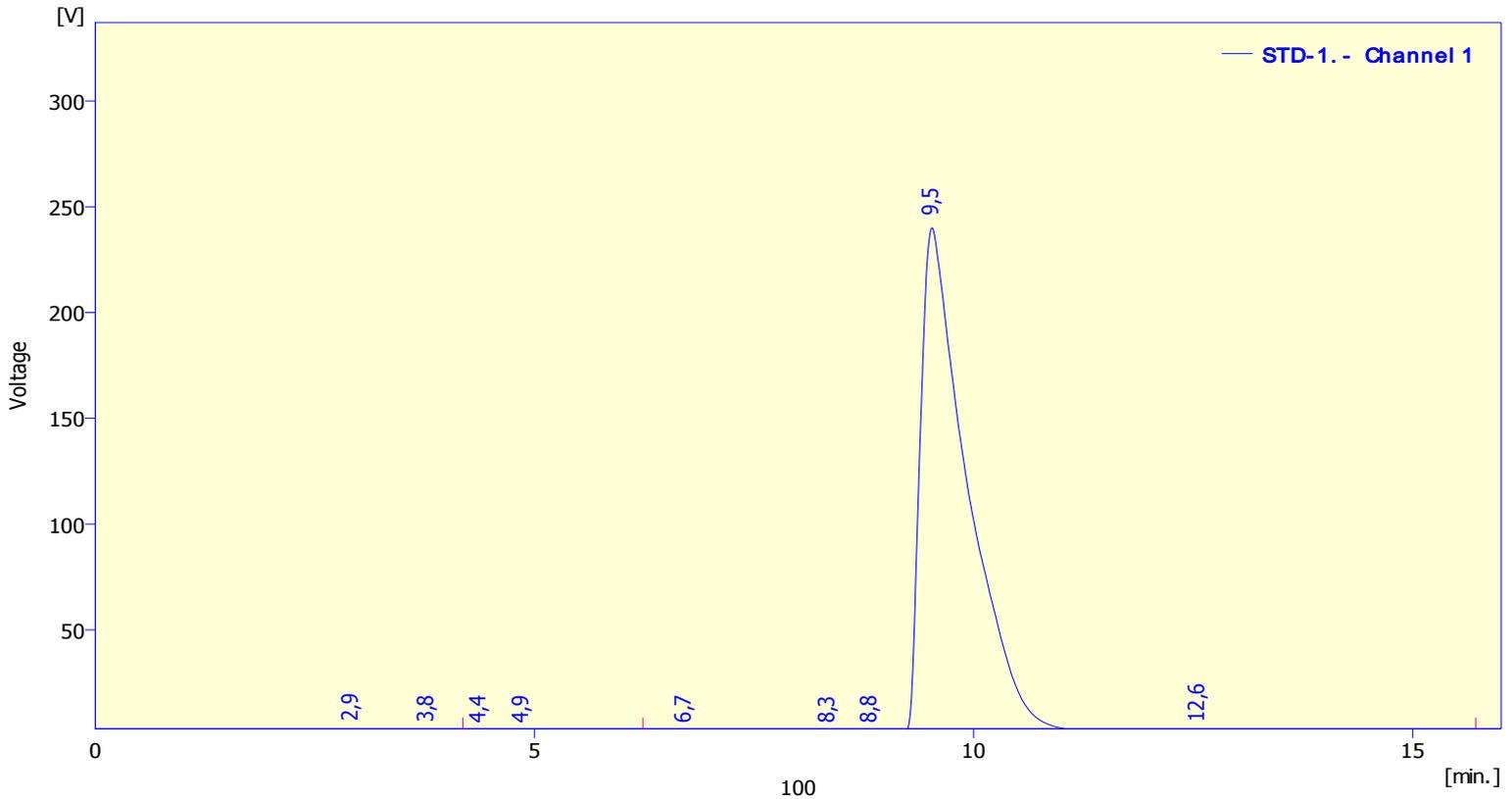
Printed Version : 04/06/2018 09:52:30
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty
Calibration File : None
Printed Date : 04/06/2018 09:56:26
By : TOUATI Souad

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage
Sample : Metformine hydrochloride
Inj. Volume [mL] : 20
Amount : 0
ISTD Amount : 0
Dilution : 1

Method : METFORMNE
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52
By : faycal
Modified : 04/06/2018 09:52

Column : C18
Mobile Phase : Acetonitrile/SA
Flow Rate : 1 mL/L
Note :
Detection : Detecteur UV-Visible
Temperature : 30°C
Pressure :



Result Table (Uncal - STD-1. - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	2,917	95,733	3,352	0,3		0,876
2	3,777	54,282	1,785	0,2	1,123	1,132
3	4,373	6,613	0,574	0,0	0,926	0,940
4	4,860	45,404	0,957	0,1	0,620	2,343
5	6,710	22,714	1,846	0,1	2,399	0,897
6	8,347	46,154	0,640	0,1	1,220	0,518
7	8,823	32,220	0,841	0,1	0,262	0,855
8	9,527	30379,768	800,892	98,3	0,648	2,750
9	12,557	207,976	3,061	0,7	2,427	3,434
	Total	30890,865	813,948	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name	: C:\YLClarity\Work1\DATA\STD-4.PRM	File Created	: 04/06/2018 12:20:35
Origin	: Acquired	Acquired Date	: 04/06/2018 12:20:35
Project	: C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ	By	: TOUATI Souad

Printed Version Info:

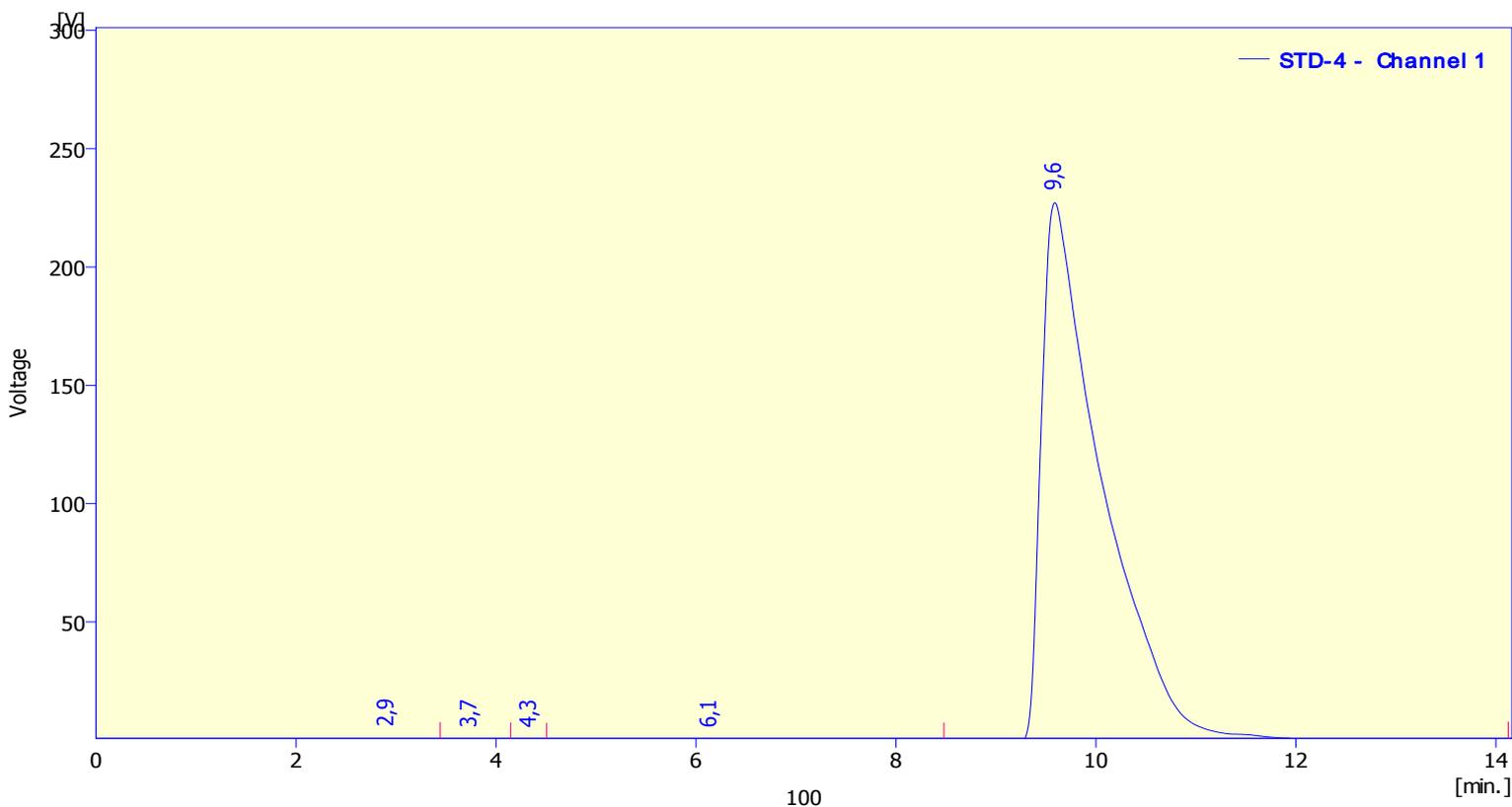
Printed Version	: 04/06/2018 12:20:35	Printed Date	: 04/06/2018 12:24:02
Report Style	: C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty	By	: TOUATI Souad
Calibration File	: None		

Sample Info:

Sample ID	: Metformine hydrochloride /Dosage	Amount	: 0
Sample	: Metformine hydrochloride	ISTD Amount	: 0
Inj. Volume [mL]	: 20	Dilution	: 1

Method	: METFORMNE	By	: faycal
Description	: METFORMINE		
Created	: 03/06/2018 09:52	Modified	: 04/06/2018 12:20

Column	: C18	Detection	: Detecteur UV-Visible
Mobile Phase	: Acetonitrile/SA	Temperature	: 30°C
Flow Rate	: 1 mL/L	Pressure	:
Note	:		



Result Table (Uncal - STD-4 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	2,913	41,803	2,101	0,1		0,865
2	3,743	28,877	0,994	0,1	1,367	1,207
3	4,340	23,738	2,098	0,1	1,046	0,923
4	6,143	261,984	1,650	0,8	0,696	1,183
5	9,590	31924,585	758,223	98,9	1,175	2,993
	Total	32280,987	765,067	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\STD-5. .PRM
Origin : Acquired
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ

File Created : 04/06/2018 11:45:03
Acquired Date : 04/06/2018 11:45:02
By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

Printed Version : 04/06/2018 11:45:03
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty
Calibration File : None

Printed Date : 04/06/2018 11:45:47
By : TOUATI Souad

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage
Sample : Metformine hydrochloride
Inj. Volume [mL] : 20

Amount : 0
ISTD Amount : 0
Dilution : 1

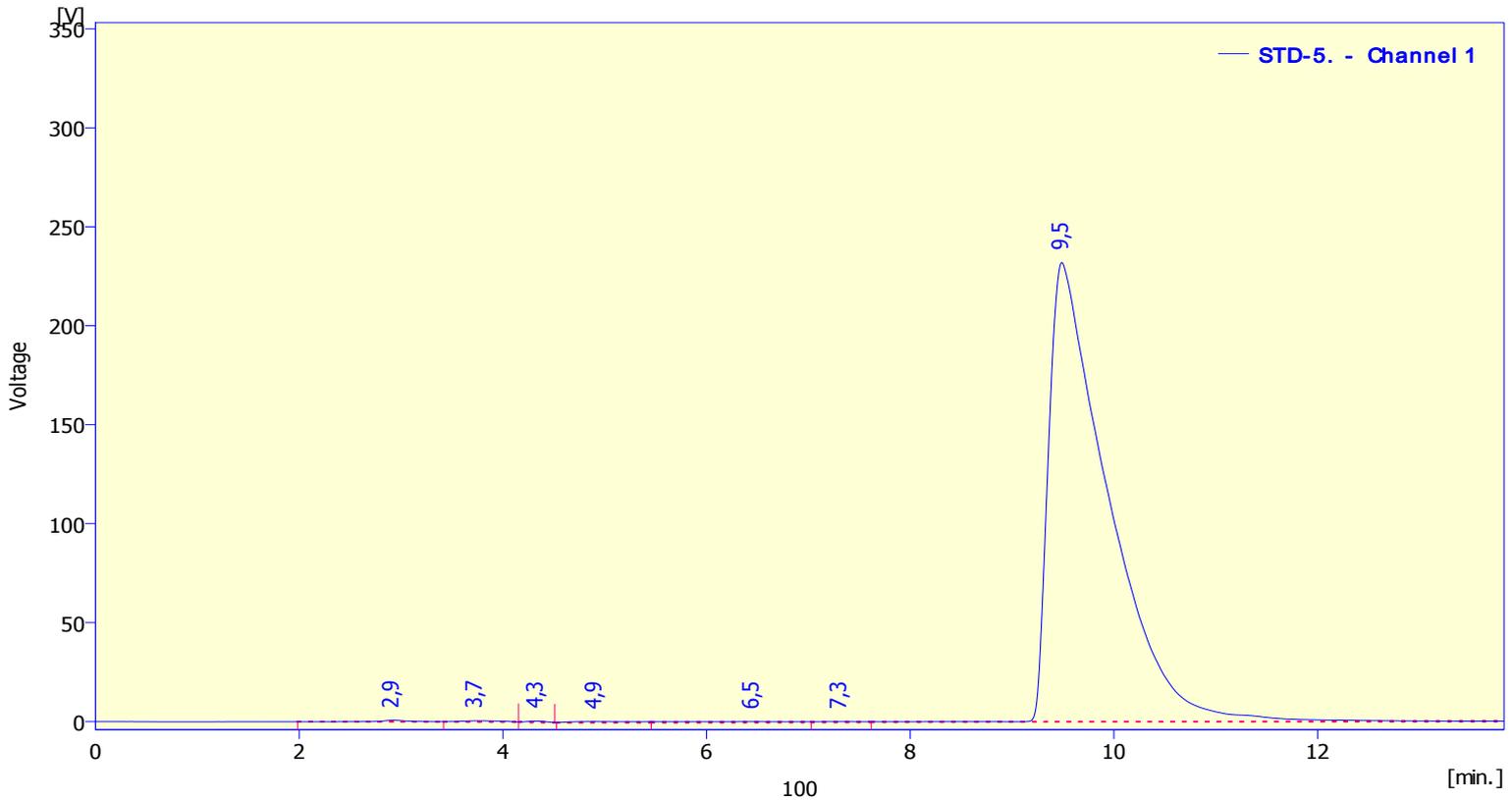
Method : METFORMNE
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52

By : faycal

Modified : 04/06/2018 11:45

Column : C18
Mobile Phase : Acetonitrile/SA
Flow Rate : 1 mL/L
Note :

Detection : Detecteur UV-Visible
Temperature : 30°C
Pressure :



Result Table (Uncal - STD-5. - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	2,917	61,380	2,640	0,2		0,862
2	3,733	55,568	1,931	0,2	1,296	1,126
3	4,330	21,922	1,907	0,1	1,015	0,979
4	4,907	61,741	1,477	0,2	0,667	1,271
5	6,453	89,392	1,099	0,3	0,766	0,788
6	7,313	26,301	0,908	0,1	0,470	1,029
7	9,490	31293,873	773,575	99,0	2,152	2,926
	Total	31610,177	783,537	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name	: C:\YLClarity\Work1\DATA\STD-6.PRM	File Created	: 04/06/2018 12:01:55
Origin	: Acquired	Acquired Date	: 04/06/2018 12:01:55
Project	: C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ	By	: TOUATI Souad

Printed Version Info:

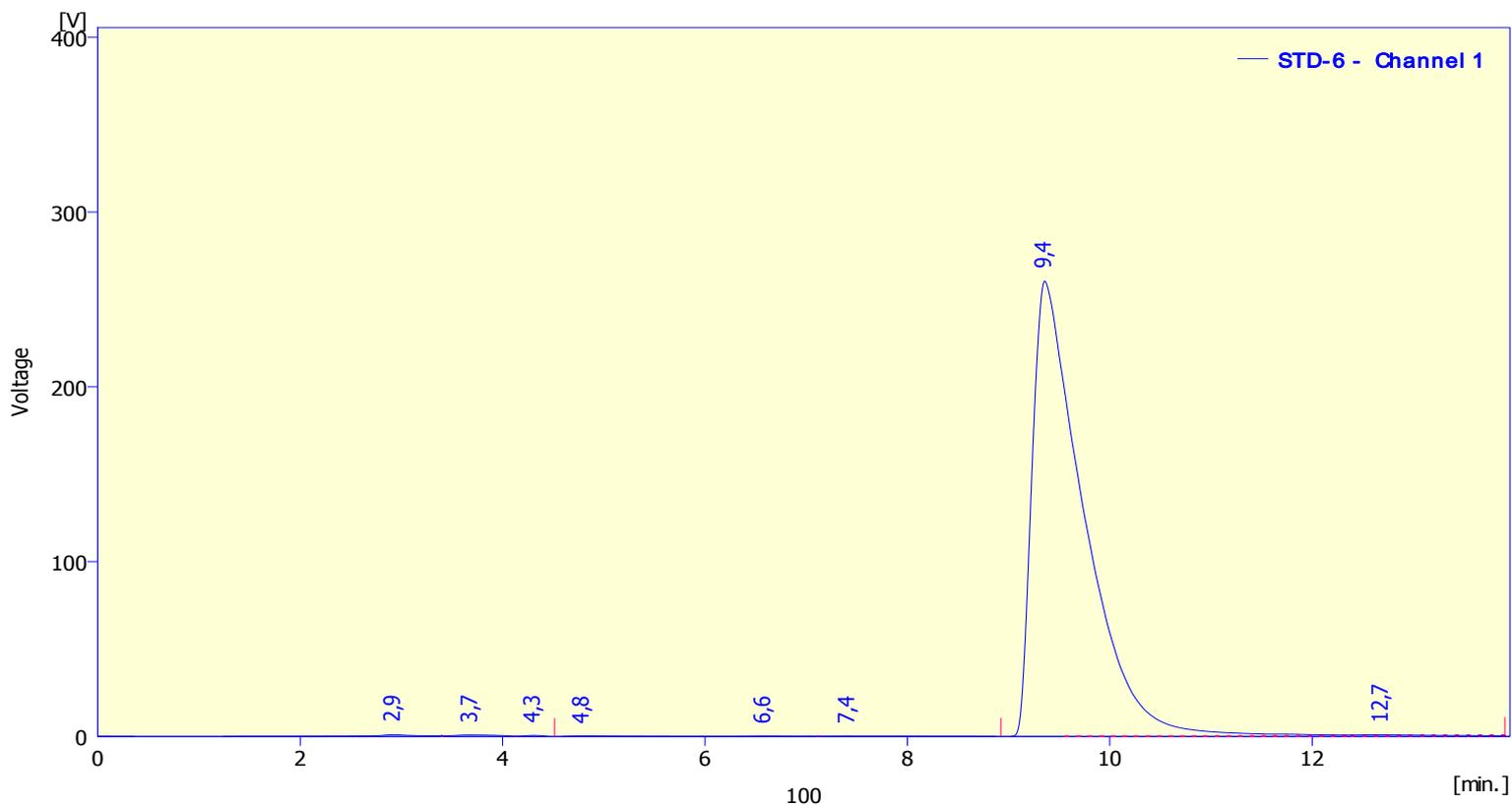
Printed Version	: 04/06/2018 12:01:55	Printed Date	: 04/06/2018 12:02:21
Report Style	: C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty	By	: TOUATI Souad
Calibration File	: None		

Sample Info:

Sample ID	: Metformine hydrochloride /Dosage	Amount	: 0
Sample	: Metformine hydrochloride	ISTD Amount	: 0
Inj. Volume [mL]	: 20	Dilution	: 1

Method	: METFORMNE	By	: faycal
Description	: METFORMINE		
Created	: 03/06/2018 09:52	Modified	: 04/06/2018 12:01

Column	: C18	Detection	: Detecteur UV-Visible
Mobile Phase	: Acetonitrile/SA	Temperature	: 30°C
Flow Rate	: 1 mL/L	Pressure	:
Note	:		



Result Table (Uncal - STD-6 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	2,923	155,687	3,571	0,5		0,637
2	3,690	104,444	3,166	0,3	0,825	1,261
3	4,307	31,174	2,365	0,1	0,818	1,010
4	4,790	64,458	1,383	0,2	0,556	2,753
5	6,583	41,108	0,965	0,1	1,408	0,905
6	7,417	49,383	0,733	0,2	0,438	3,011
7	9,357	30746,886	868,377	98,3	1,108	2,646
8	12,687	91,503	1,947	0,3	2,903	2,322
	Total	31284,642	882,508	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine, HCl 500-2.PRM File Created : 04/06/2018 12:52:58
Origin : Acquired Acquired Date : 04/06/2018 12:52:57
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

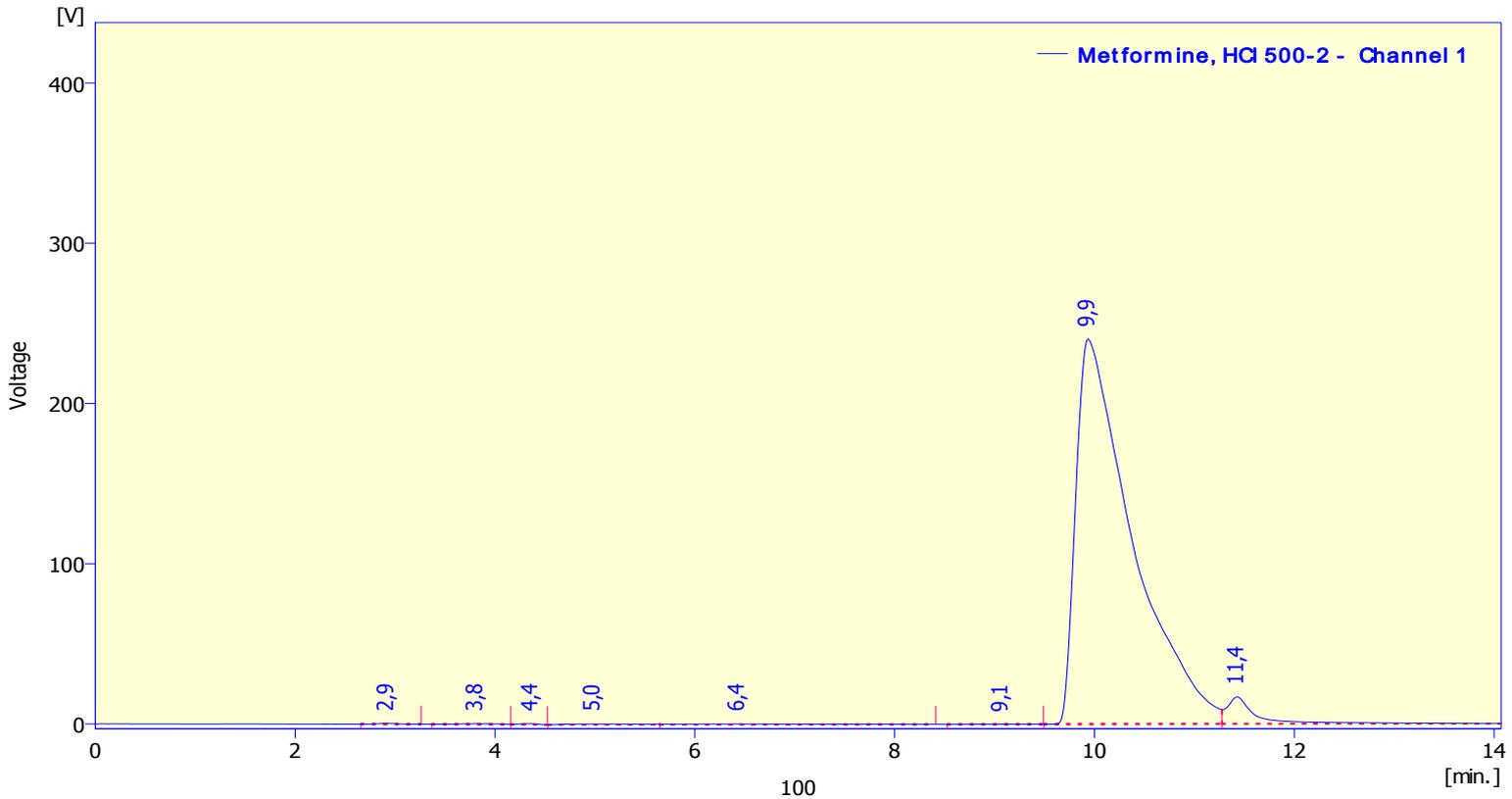
Printed Version : 04/06/2018 12:54:26 Printed Date : 04/06/2018 12:55:25
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 04/06/2018 12:54

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine, HCl 500-2 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	2,920	21,338	1,563	0,1		1,177
2	3,810	32,710	1,201	0,1	1,529	0,919
3	4,363	24,288	2,034	0,1	0,937	0,860
4	4,987	93,899	1,766	0,3	0,603	1,260
5	6,433	144,265	1,466	0,4	0,521	1,674
6	9,070	5,964	0,192	0,0	1,102	0,884
7	9,937	31282,135	801,383	95,3	0,921	3,055
8	11,430	1215,147	56,154	3,7	2,081	3,652
	Total	32819,747	865,758	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine, HCl 500-5.PRM File Created : 05/06/2018 10:30:54
Origin : Acquired Acquired Date : 05/06/2018 10:30:54
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

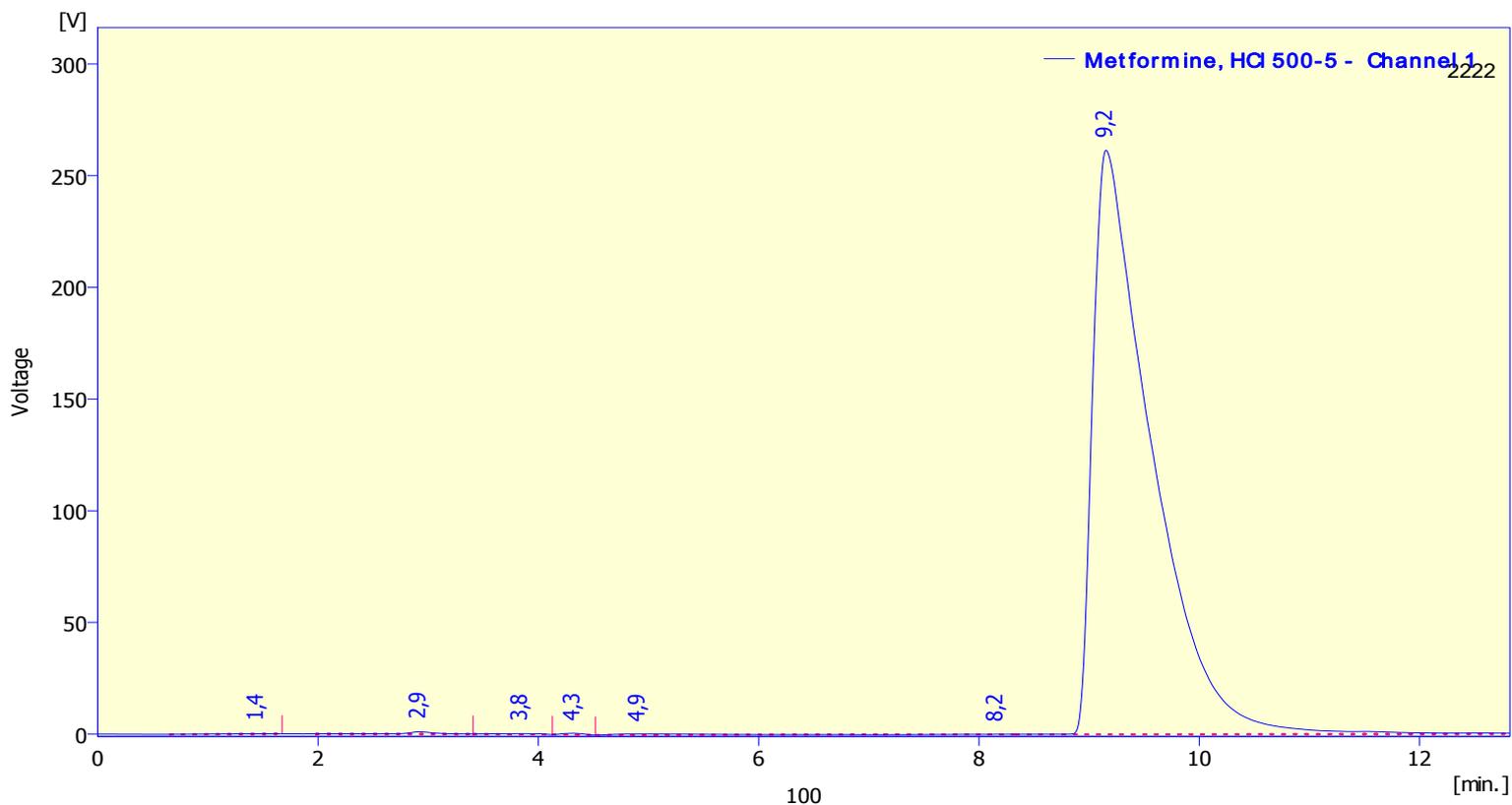
Printed Version : 05/06/2018 10:30:54 Printed Date : 05/06/2018 10:33:43
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 10:30

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine, HCl 500-5 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	1,443	7,150	0,200	0,0		0,628
2	2,917	53,657	3,163	0,2	2,804	0,851
3	3,840	25,034	0,957	0,1	1,313	0,839
4	4,317	27,687	2,187	0,1	0,675	1,000
5	4,907	124,514	1,591	0,4	0,399	3,690
6	8,157	22,814	0,435	0,1	1,735	0,589
7	9,153	32246,708	871,737	99,2	0,951	2,899
	Total	32507,565	880,269	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLCLARITY\WORK1\DATA\METFORMINE, HCL 500-10.PRM File Created : 04/06/2018 13:13:19
Origin : Acquired Acquired Date : 04/06/2018 13:13:18
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

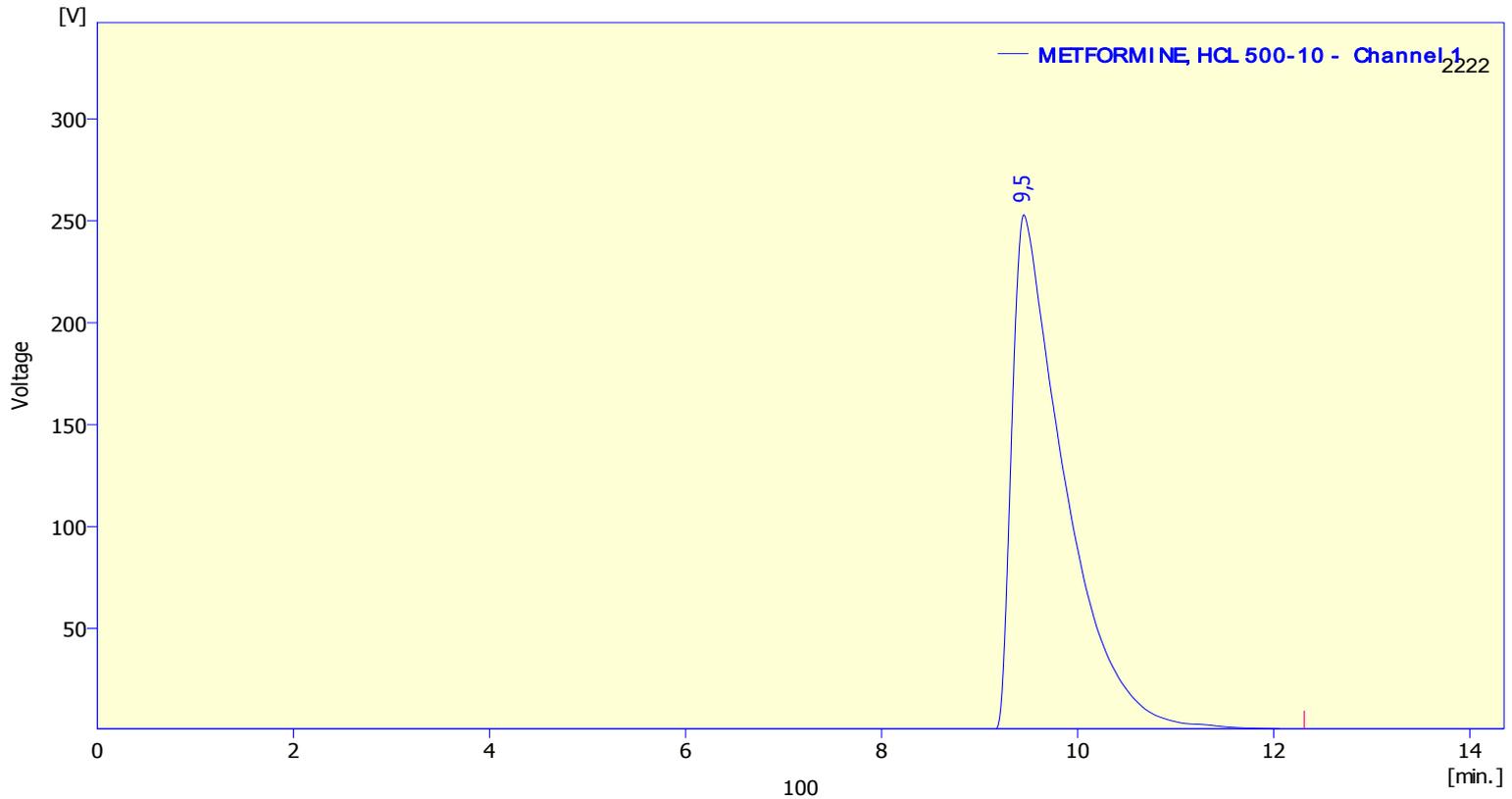
Printed Version : Modified Printed Date : 05/06/2018 14:35:26
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 14:34

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - METFORMINE, HCL 500-10 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	9,450	31582,323	843,271	100,0		3,029
	Total	31582,323	843,271	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLCLARITY\WORK1\DATA\METFORMINE, HCL 500-17.PRM File Created : 04/06/2018 15:15:02
Origin : Acquired Acquired Date : 04/06/2018 15:15:02
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

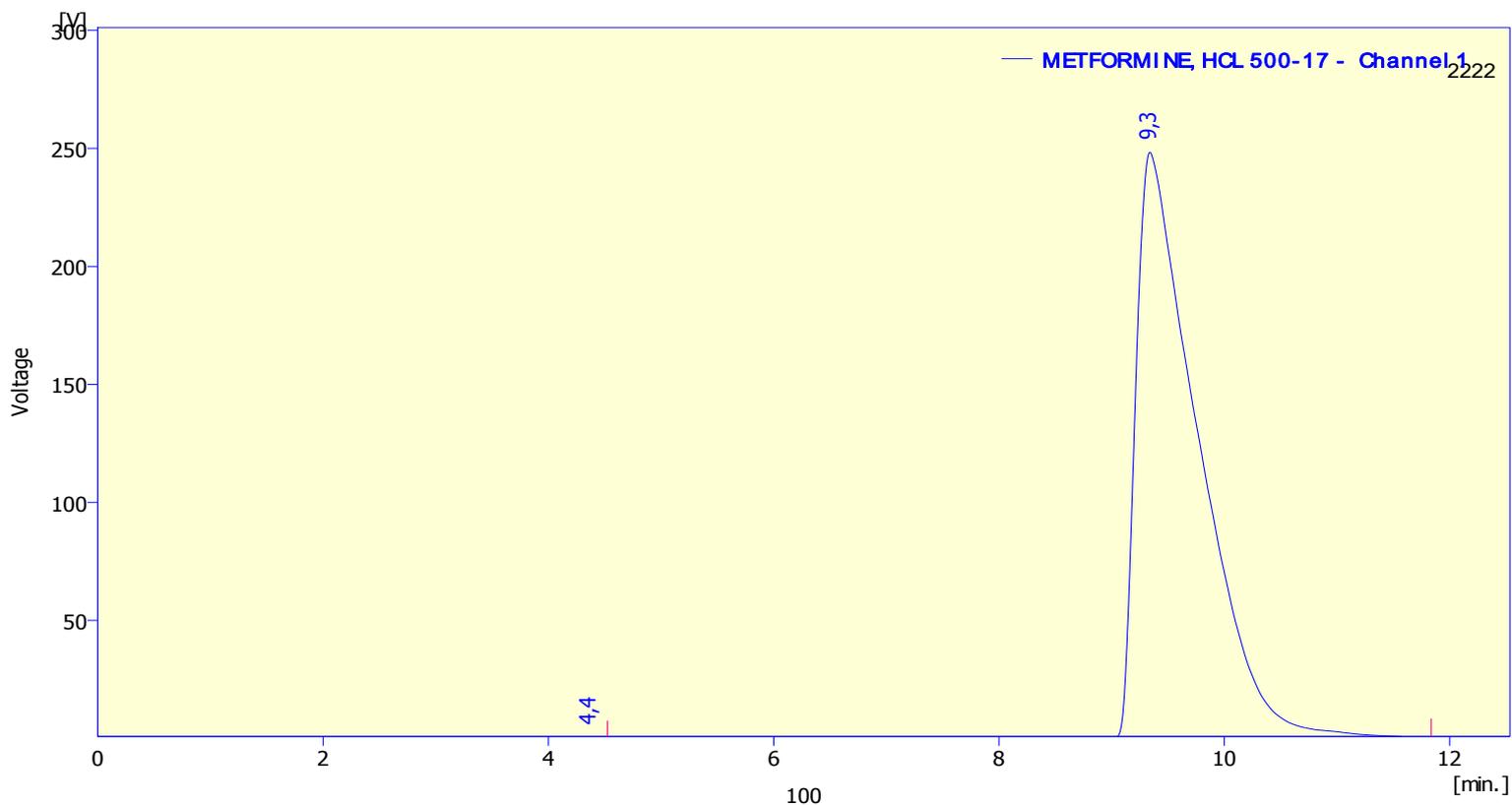
Printed Version : Modified Printed Date : 05/06/2018 14:38:53
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 14:38

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - METFORMINE, HCL 500-17 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	4,363	26,782	2,317	0,1		0,845
2	9,340	31579,793	827,164	99,9	7,434	2,761
	Total	31606,575	829,481	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLCLARITY\WORK1\DATA\METFORMINE, HCL 500-18.PRM File Created : 04/06/2018 15:30:18
Origin : Acquired Acquired Date : 04/06/2018 15:50:07
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

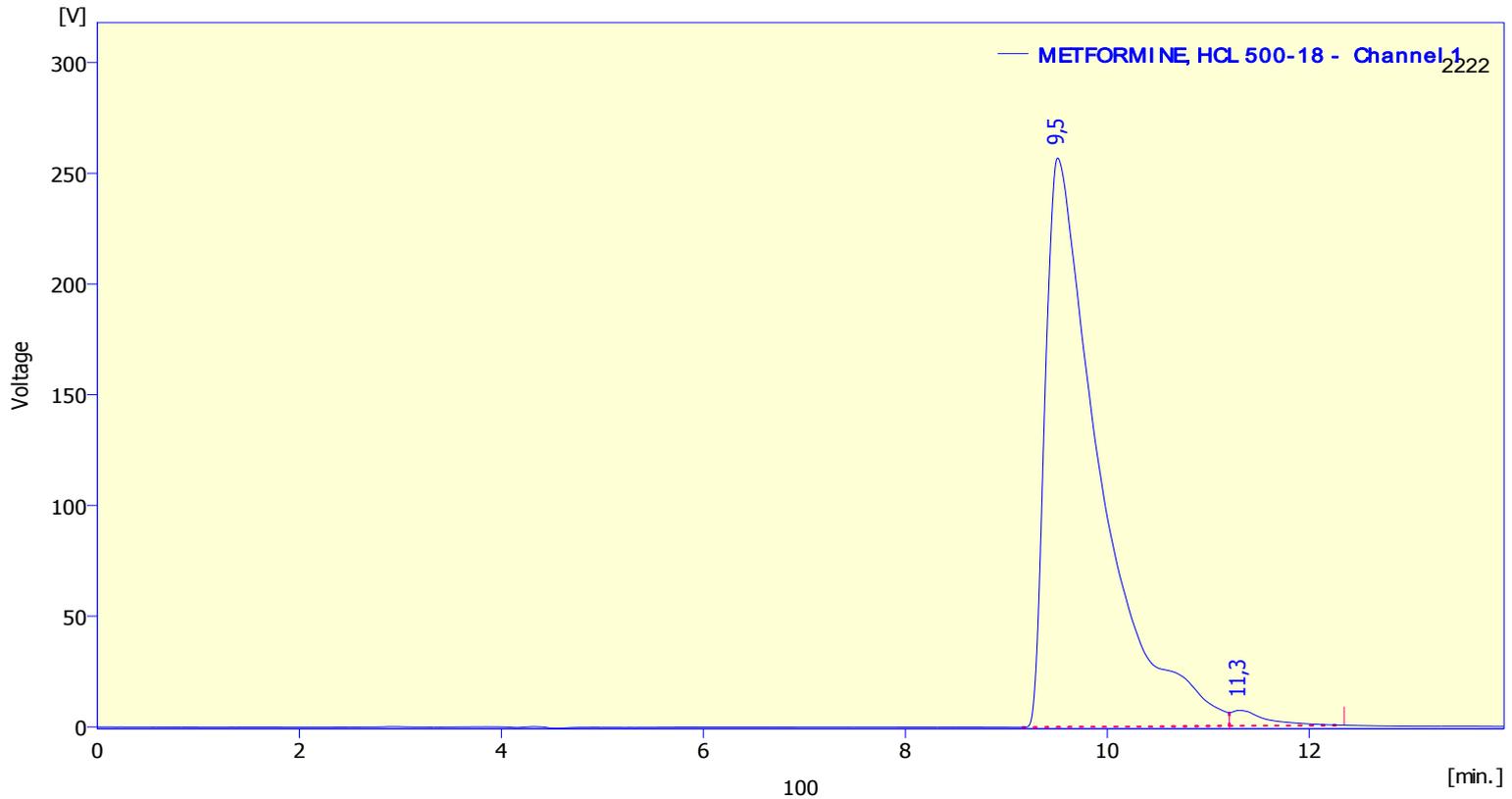
Printed Version : Modified Printed Date : 05/06/2018 14:47:56
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 14:46

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - METFORMINE, HCL 500-18 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	9,508	32069,808	856,545	98,3		3,528
2	11,307	561,490	23,397	1,7	2,516	4,720
	Total	32631,297	879,942	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine, HCl 850-5.PRM File Created : 05/06/2018 12:16:49
Origin : Acquired Acquired Date : 05/06/2018 12:16:49
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

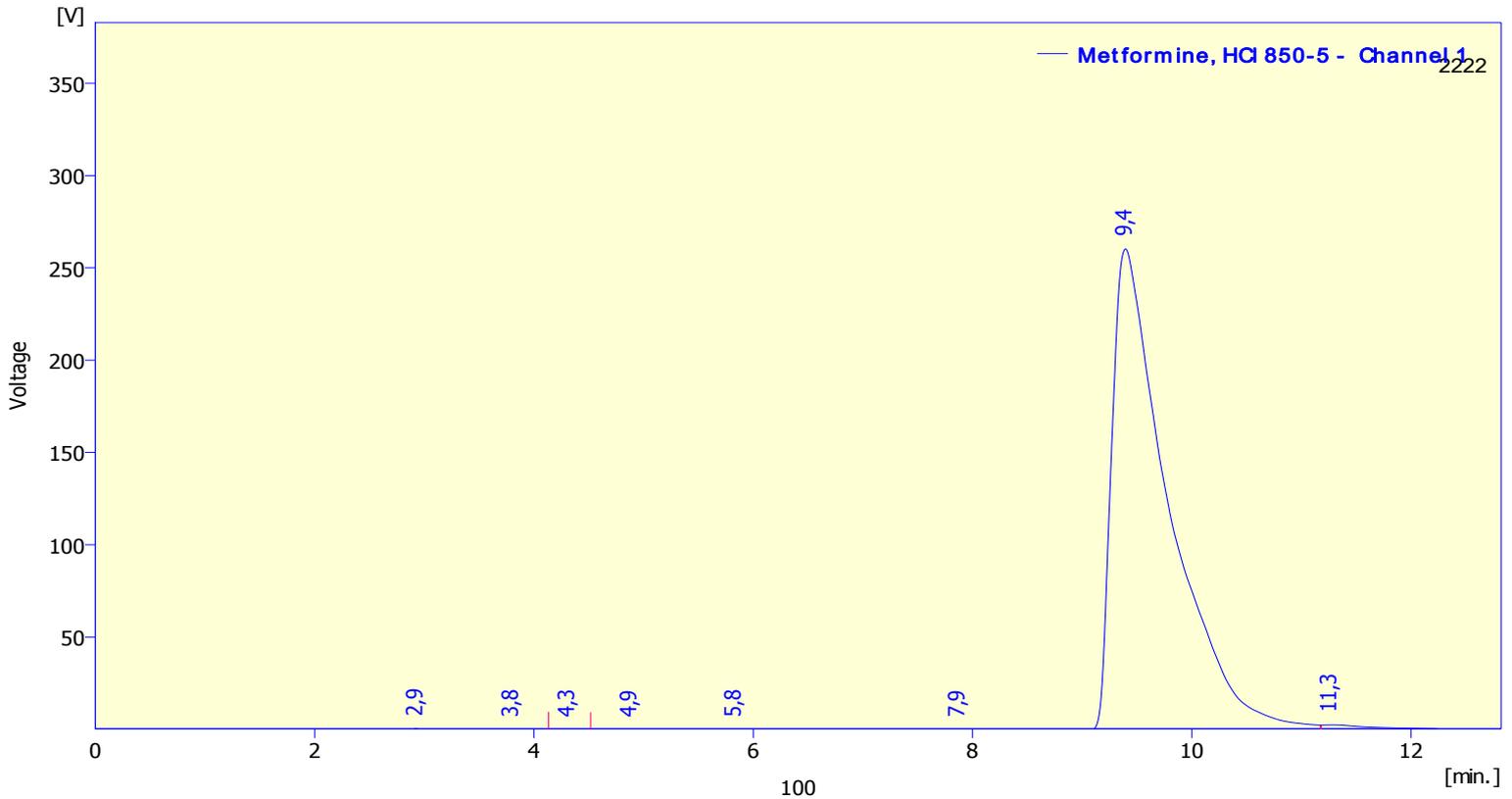
Printed Version : 05/06/2018 12:16:49 Printed Date : 05/06/2018 12:17:34
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 12:16

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine, HCl 850-5 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	2,927	54,585	2,514	0,2		0,943
2	3,800	40,244	1,126	0,1	1,089	0,868
3	4,310	28,224	2,205	0,1	0,664	1,074
4	4,877	37,839	1,577	0,1	1,050	0,763
5	5,830	144,082	1,676	0,5	0,537	1,235
6	7,870	61,843	0,853	0,2	0,769	1,069
7	9,397	31247,055	868,925	97,7	0,919	2,879
8	11,263	361,900	9,114	1,1	2,167	9,019
	Total	31975,771	887,989	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine, HCl 850-8.PRM File Created : 05/06/2018 13:02:05
Origin : Acquired Acquired Date : 05/06/2018 13:02:05
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

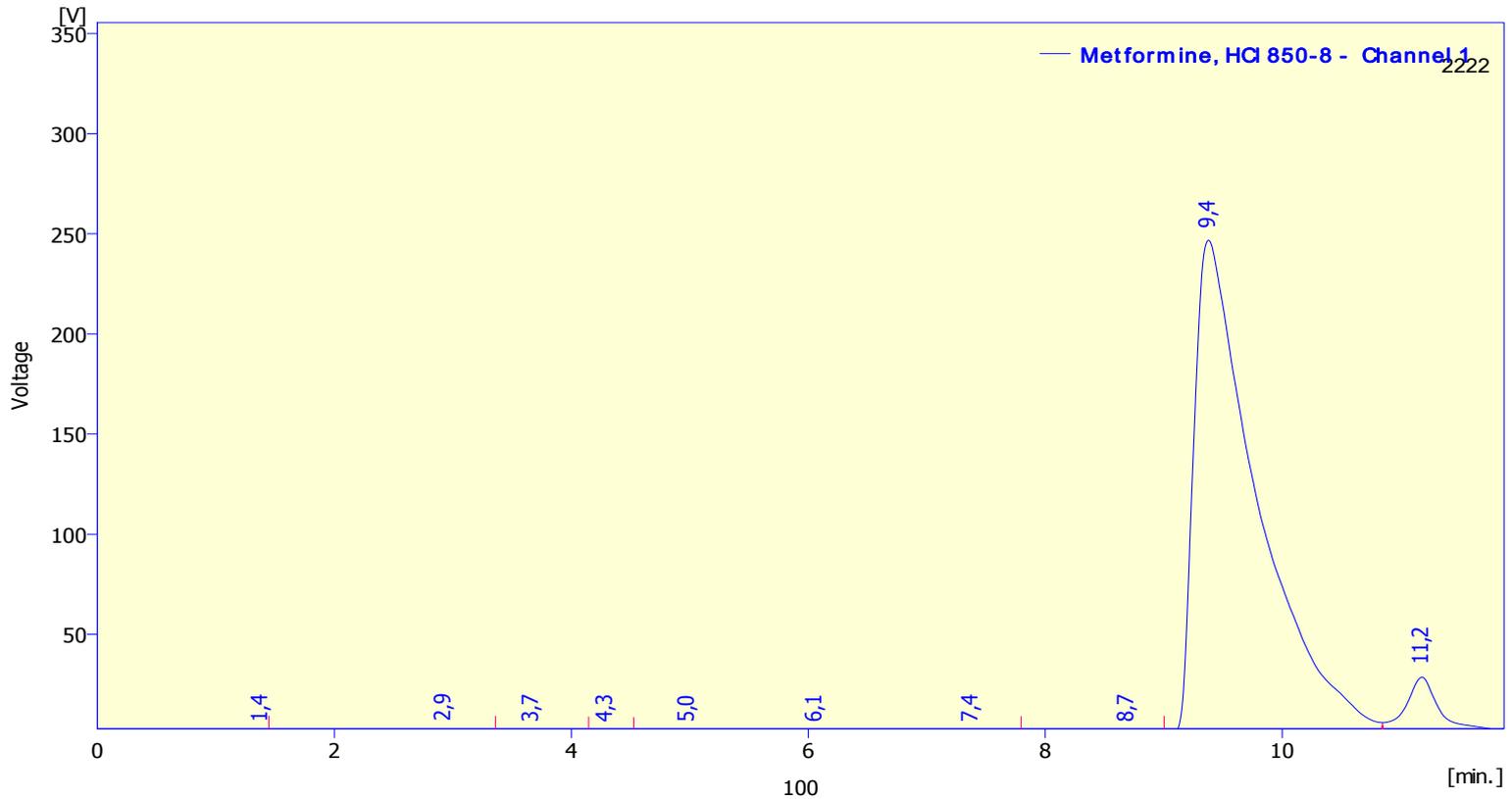
Printed Version : 05/06/2018 13:02:05 Printed Date : 05/06/2018 13:03:38
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 13:02

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine, HCl 850-8 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	1,383	2,353	0,058	0,0		0,539
2	2,927	29,989	1,605	0,1	5,938	0,671
3	3,667	25,243	0,690	0,1	1,061	1,295
4	4,293	22,653	1,631	0,1	0,905	1,321
5	4,983	43,662	1,249	0,1	0,969	0,861
6	6,060	56,042	0,935	0,2	0,753	0,692
7	7,377	42,048	0,473	0,1	0,694	0,694
8	8,693	9,909	0,322	0,0	0,918	0,736
9	9,380	30653,650	822,009	93,1	0,769	3,203
10	11,180	2056,063	93,592	6,2	2,677	1,550
	Total	32941,613	922,565	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine, HCl 850-13.PRM File Created : 05/06/2018 14:05:15
Origin : Acquired Acquired Date : 05/06/2018 14:05:15
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

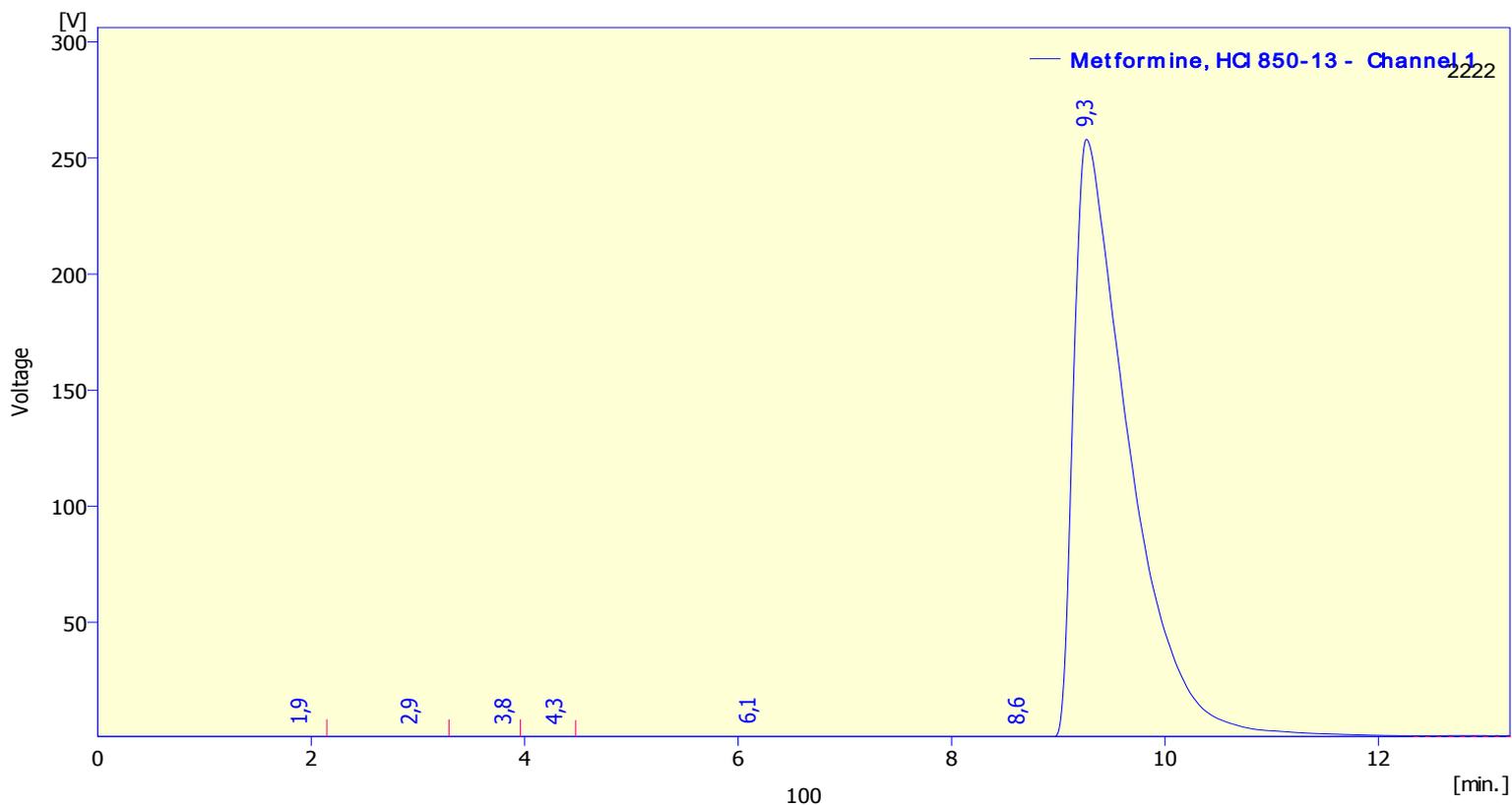
Printed Version : 05/06/2018 14:05:15 Printed Date : 05/06/2018 14:08:17
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 14:05

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine, HCl 850-13 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	1,907	8,733	0,213	0,0		0,653
2	2,937	9,254	0,666	0,0	1,665	1,250
3	3,817	3,888	0,181	0,0	2,023	0,669
4	4,297	11,025	1,047	0,0	1,188	1,060
5	6,107	209,114	2,061	0,7	1,189	0,786
6	8,627	82,309	0,659	0,3	0,952	0,588
7	9,267	31027,980	858,556	99,0	0,371	2,800
	Total	31352,305	863,384	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine, HCl 850-14.PRM File Created : 05/06/2018 14:21:13
Origin : Acquired Acquired Date : 05/06/2018 14:21:13
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

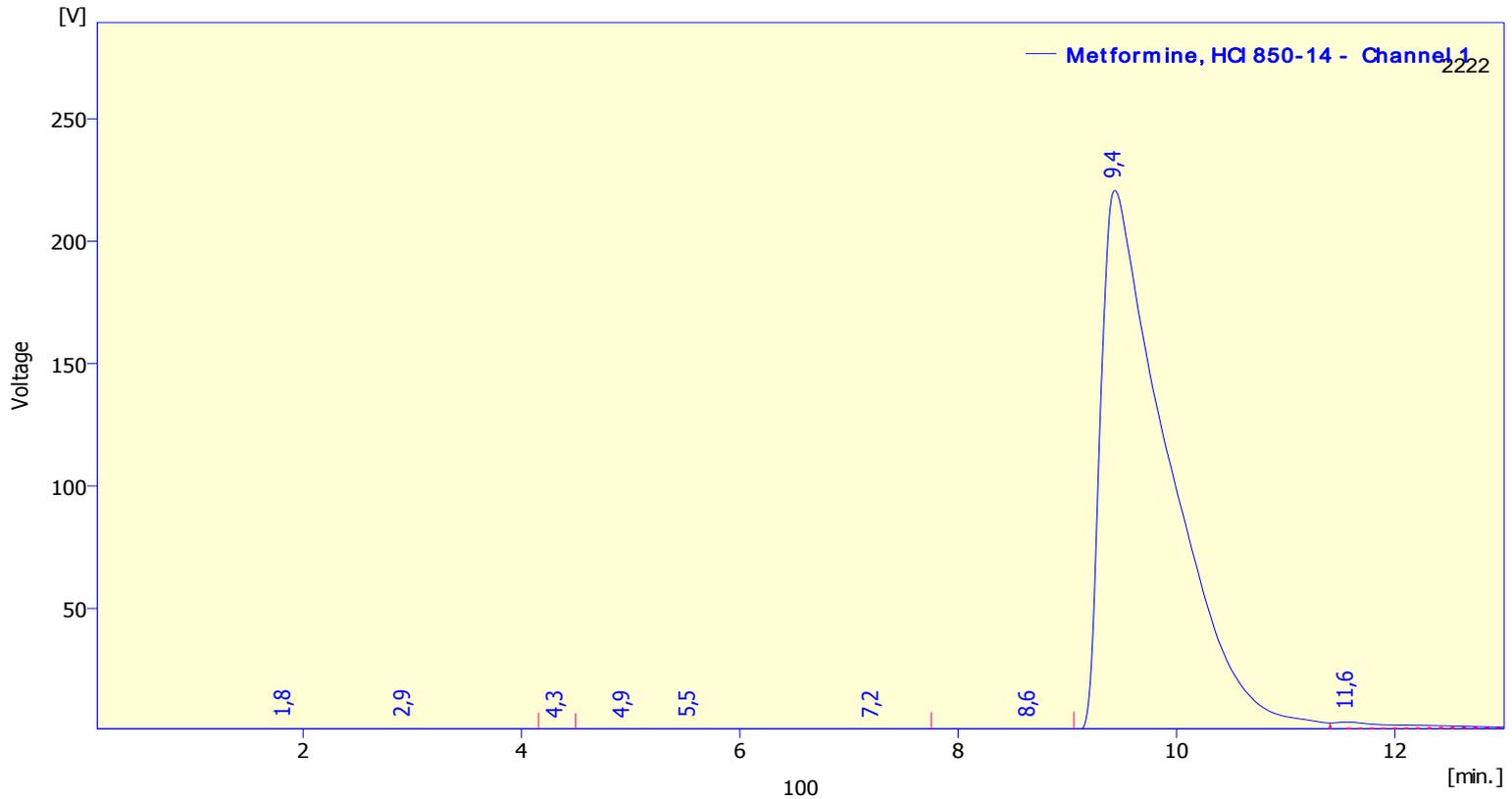
Printed Version : 05/06/2018 14:21:38 Printed Date : 05/06/2018 14:22:19
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 14:21

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine, HCl 850-14 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	1,827	95,939	1,613	0,3		0,921
2	2,923	126,156	1,953	0,4	0,517	1,871
3	4,320	14,668	1,246	0,0	1,017	1,022
4	4,930	53,097	1,921	0,2	1,059	0,727
5	5,533	121,589	1,851	0,4	0,371	1,705
6	7,213	35,804	0,659	0,1	0,804	0,889
7	8,647	22,326	0,555	0,1	0,987	0,765
8	9,433	31476,320	734,424	97,2	0,693	3,164
9	11,560	445,404	8,950	1,4	1,669	6,359
	Total	32391,303	753,172	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine, HCl 850-15.PRM File Created : 05/06/2018 14:38:59
Origin : Acquired Acquired Date : 05/06/2018 14:38:58
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

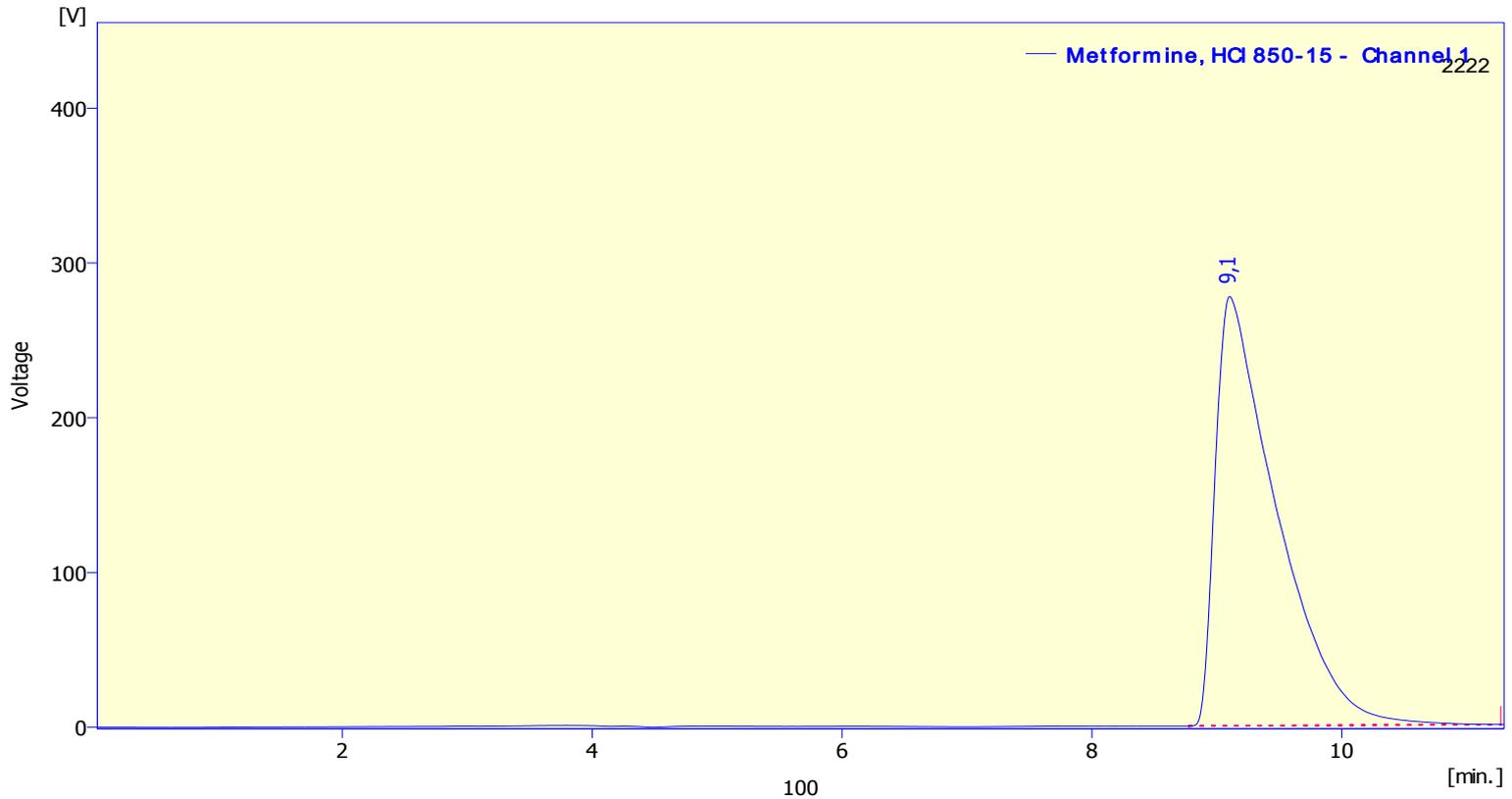
Printed Version : Modified Printed Date : 05/06/2018 14:43:25
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 14:42

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine, HCl 850-15 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	9,103	31508,044	924,737	100,0		2,716
	Total	31508,044	924,737	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine,HCL-1000-1.PRM File Created : 04/06/2018 10:47:24
Origin : Acquired Acquired Date : 04/06/2018 10:47:24
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

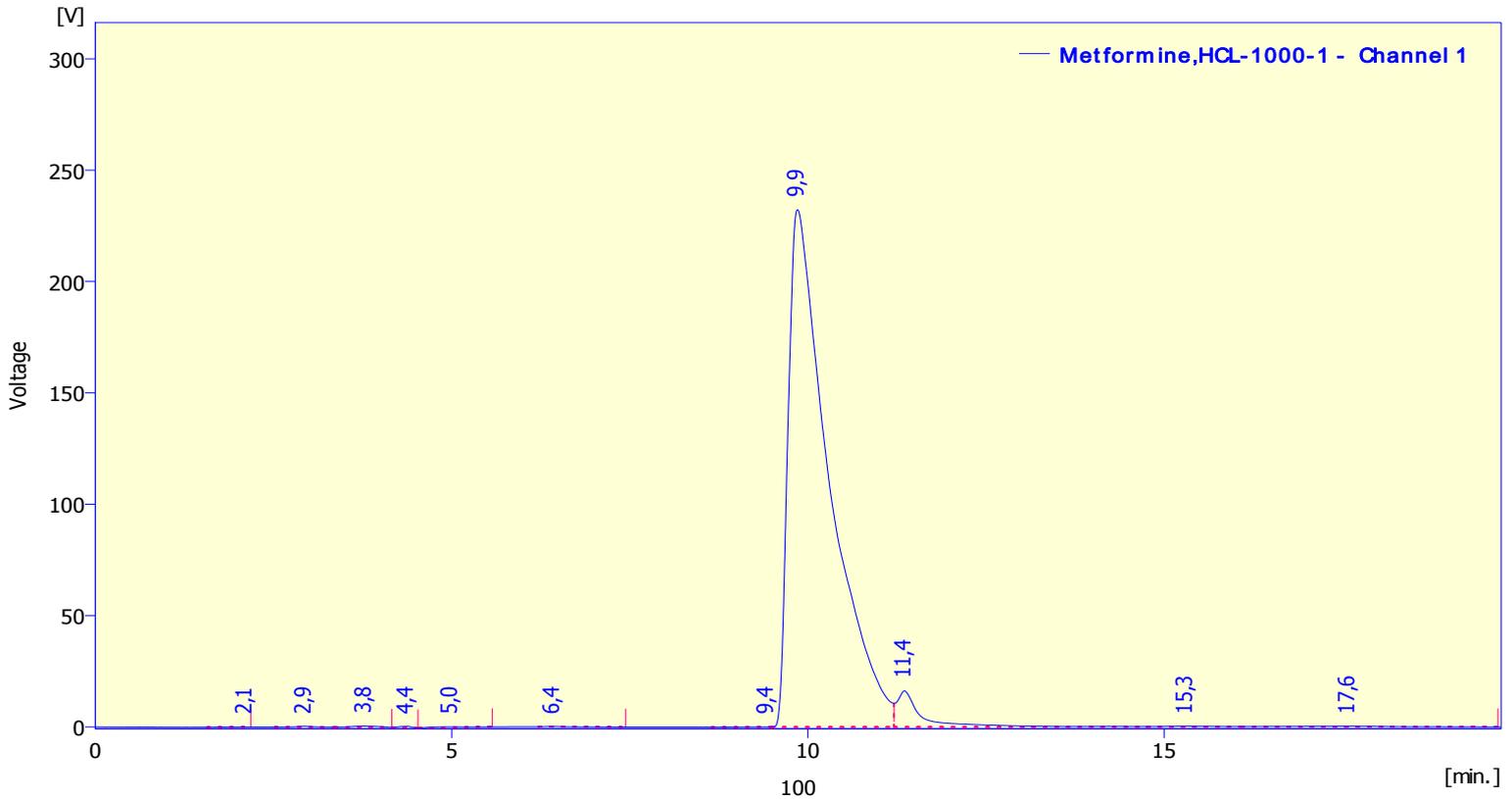
Printed Version : 04/06/2018 10:51:35 Printed Date : 04/06/2018 10:52:19
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 04/06/2018 10:51

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine,HCL-1000-1 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	2,107	3,206	0,097	0,0		0,559
2	2,937	30,064	1,319	0,1	1,959	1,057
3	3,780	53,406	1,810	0,2	1,276	0,925
4	4,373	24,986	2,143	0,1	0,995	0,839
5	4,990	40,697	1,055	0,1	0,676	1,112
6	6,423	12,224	0,507	0,0	1,524	3,292
7	9,427	13,698	0,477	0,0	4,899	0,545
8	9,853	30885,575	774,684	94,5	0,479	3,093
9	11,357	1400,103	54,273	4,3	2,031	4,864
10	15,307	75,213	1,180	0,2	2,871	1,210
11	17,583	137,679	1,089	0,4	0,755	1,159
	Total	32676,851	838,634	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine,HCL-1000-1.PRM File Created : 04/06/2018 10:47:24
Origin : Acquired Acquired Date : 04/06/2018 10:47:24
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

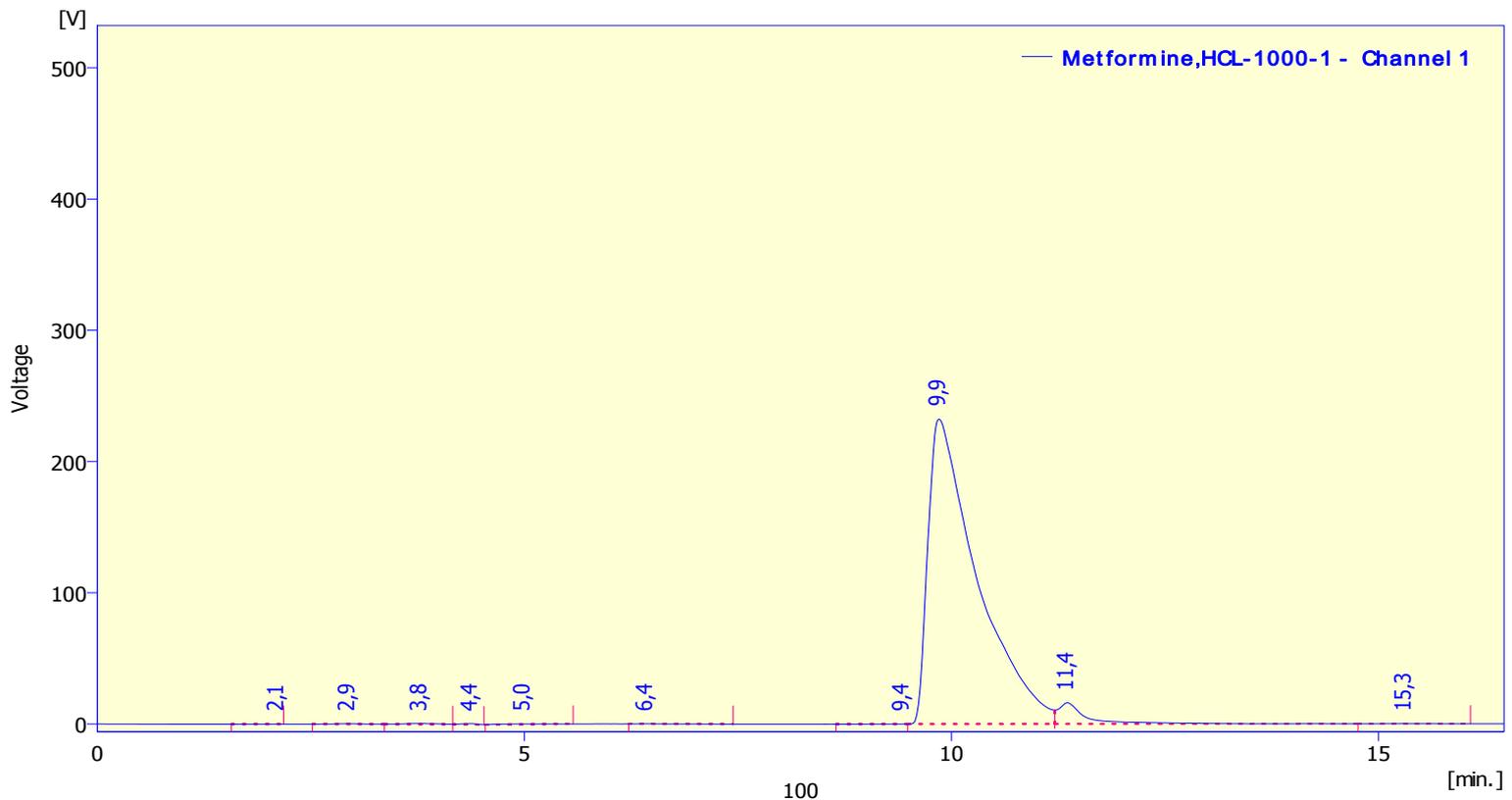
Printed Version : 04/06/2018 10:48:30 Printed Date : 04/06/2018 10:49:34
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 04/06/2018 10:48

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine,HCL-1000-1 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	2,107	3,206	0,097	0,0		0,559
2	2,937	30,064	1,319	0,1	1,959	1,057
3	3,780	53,406	1,810	0,2	1,276	0,925
4	4,373	24,986	2,143	0,1	0,995	0,839
5	4,990	40,697	1,055	0,1	0,676	1,112
6	6,423	12,224	0,507	0,0	1,524	3,292
7	9,427	11,746	0,405	0,0	5,063	0,546
8	9,853	30869,305	774,572	95,3	0,490	3,093
9	11,357	1314,533	54,022	4,1	2,031	4,545
10	15,307	25,391	0,564	0,1	4,439	1,177
	Total	32385,558	836,494	100,0		

**Clarity - Chromatography SW**

CRAPC Bousmail

Atelier HPLC+SAA

Chromatogram Info:

File Name : C:\YLClarity\Work1\DATA\Metformine, HCl 1000-3.PRM File Created : 05/06/2018 15:07:34
Origin : Acquired Acquired Date : 05/06/2018 15:07:33
Project : C:\YLClarity\Projects\Work1.PRJ By : TOUATI Souad

Printed Version Info:

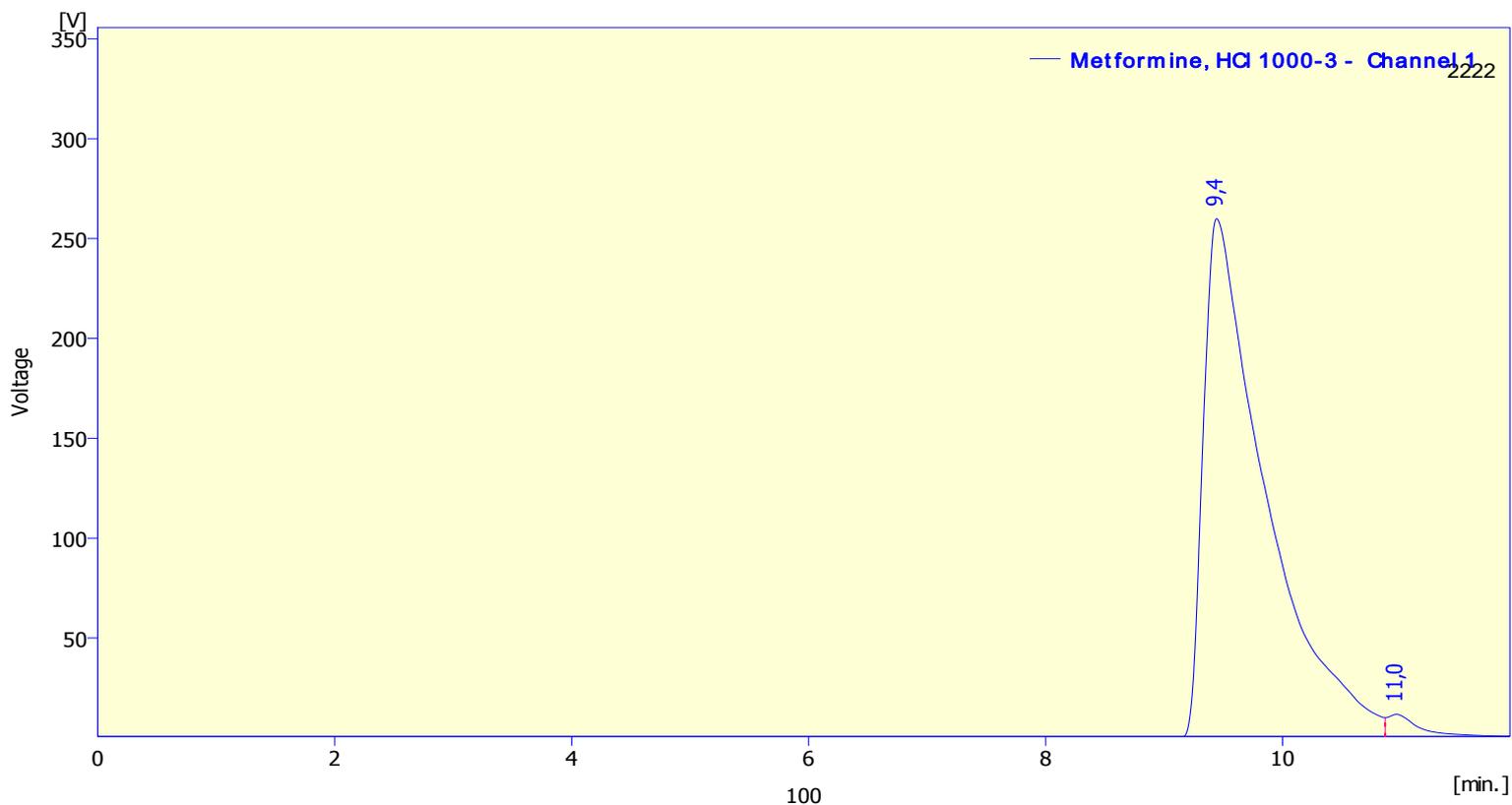
Printed Version : Modified Printed Date : 05/06/2018 15:08:55
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : TOUATI Souad
Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Metformine hydrochloride /Dosage Amount : 0
Sample : Metformine hydrochloride ISTD Amount : 0
Inj. Volume [mL] : 20 Dilution : 1

Method : METFORMNE By : faycal
Description : METFORMINE
Created : 03/06/2018 09:52 Modified : 05/06/2018 15:07

Column : C18 Detection : Detecteur UV-Visible
Mobile Phase : Acetonitrile/SA Temperature : 30°C
Flow Rate : 1 mL/L Pressure :
Note :



Result Table (Uncal - Metformine, HCl 1000-3 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Resolution [-]	Symmetry/Tail ing [-]
1	9,443	31541,261	865,975	97,8		3,403
2	10,960	714,750	37,605	2,2	2,304	4,250
	Total	32256,011	903,580	100,0		