

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR



ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA-1

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE



*OPTIMISATION DE LA METHODE DE DOSAGE
PAR HPLC DU CHLORHYDRATE
D'AMIODARONE DANS LES COMPRIMES
DOSES A 200 mg*

Thèse d'exercice présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Session : Juin 2019

Présentée par :

- TERRAI Chahra**
- ZEKKARI Nesrine**
- AMRANI Soumia**

Promotrice du mémoire :

-**Dr.BELAIDLF** : Maitre assistante en chimie analytique .

Devant le Jury :

- Dr.DJELLOULIS**: Maître assistant en pharmacologie-USDB-1- ... Président de Jury.
- Dr.AZZOUZ.L**: Maître assistante en chimie analytique -USDB-1-Examinatrice.
- Dr .BOUZEKRIF**: Maître assistant en chimie therapeutique-USDB-1- ..Examinateur.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR



ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA-1

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE



*OPTIMISATION DE LA METHODE DE DOSAGE
PAR HPLC DU CHLORHYDRATE
D'AMIODARONE DANS LES COMPRIMES
DOSES A 200 mg*

Thèse d'exercice présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Session : Juin 2019

Présentée par :

-TERRAI Chahra

-ZEKKARI Nesrine

-AMRANI Soumia

Promotrice du mémoire :

-Dr.BELAIDI.F : Maitre assistante en chimie analytique .

Devant le Jury :

-Dr.DJELLOULLIS: Maître assistant en pharmacologie-USDB-1- ... Président de Jury.

-Dr.AZZOUZ.L: Maître assistante en chimie analytique -USDB-1-Examinatrice.

-Dr .BOUZEKRI.F: Maître assistant en chimie therapeutique-USDB-1- ..Examinateur.

Remerciements

Nous remercions Dieu, le Tout Puissant, le Miséricordieux, qui nous a donné la force et le courage de mener à bien ce travail.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profond respect ainsi que notre gratitude à notre promotrice **Dr. BELAIDI.F**, maître-assistante en chimie analytique, de nous avoir encadré durant la réalisation de ce travail. Ses conseils, sa patience, sa disponibilité et son aide nous ont été très précieux.

Nos remerciements s'adressent à le président du jury **Dr.DJELLOULIS** ainsi qu'aux membres du jury **Dr .BOUZEKRI.F** et **Dr.AZZOUZ.L** de l'intérêt et du temps qu'ils nous ont accordés en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons à remercier le Professeur **GHARBLA**, responsable du laboratoire national des produits pharmaceutiques qui nous a ouvert les portes du laboratoire et qui a mis à notre disposition l'équipement et le matériel nécessaires à la réalisation de notre étude pratique.

Nous remercions également l'ensemble de l'équipe de l'unité de chimie du LNCPP et plus particulièrement **Dr.BENSEDIRA** maitre assistante en chimie thérapeutique .

Un grand hommage à tous nos enseignants et enseignantes qui nous ont encadrées durant tout notre cursus universitaire.

Sans oublier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

Je dédie cet évènement marquant de ma vie :

A la mémoire de mon **Papa** disparu trop tôt, avant même de partager cette joie avec moi. L'homme de ma vie, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, mon héro, ma source de noblesse, que je ne cesse d'admirer de m'avoir guidée et conseillée dans ma vie, que dieu te garde en son vaste paradis.

A la lumière de mes jours ,celle qui m'a donné vie ,ma très chère **Maman**, merci de m'avoir poussée et motivée dans mes étude vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude .Que Dieu te garde toujours pour moi mon ange gardien.

A la personne qui partage avec moi les plus petits détails de la vie et à qui je souhaite du bonheur, à ma sœur **Ahlam**.

A ma chère tante, qui n'a jamais cessé de formuler des prières à mon égard.

A mes chers frères et sœurs spécialement, ,mon soutien inestimable **Abdali** , le plus beau cadeau de ma vie **Sabah** le formidable **Fares** et l'adorable **Younes** . Je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides et encouragements.

A mes belles sœurs,ma famille,mes amies de promotion, mes proches et a ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité .

A ceux qui m'ont donné la chance d'apprendre, qui m'ont ouvert de nouveaux horizons, à Mme **R.ZEMRI**. et son époux **M .SAFSAFI**. et son équipe officinale.

A ma chere promotrice qui ne nous a jamais manqué de conseils et d'aide , merci .

A tous mes enseignants, tout au long de mes études .

A mes deux cheres amies : **Nesrine** et **Soumia** .

TERRAI Chahra

Dédicace

Je tiens à remercier mon D.F.E.U le tous puissant, qu'il m'a dirigé e m'a stabilisé sur l'ISLAM, m'appartenance de la meilleur nation "DÉ PROPHÉT MOHAMMED". Qui m'avoit donné la force pour fait ce travail et pour dépassé toutes difficultés

Je dédie ce modeste travail, à ma Chère mère Mouni

Mon symbole de tendresse, l'exemple de dévouement, mon source de joie et de bonheur. Qui m'encouragé, soutenu, sacrifié tout au long de mes étude et donné la puissance pour je puisse atteindre mes objectifs. Merci pour l'innombrable sacrifice pour ma réussite. Tout ce que je peux t'offre ne pourra exprimer l'amour et le respect que je te porte. Que D.F.E.U te protège et te garde pour nous.

A ma chère sœur Nada

Pour son soutien moral et leur conseil précieux, je souhaite une vie pleine de bonheur et de santé.

A mes chères amies Chahra, Soumia, Hoda.

Pour leurs soutiens et leurs patiences infinies. Merci pour tous les moments merveilleux qu'on a passé ensemble durant ces années

A ma Promotrice Dr. BELHADJ

Qui n'as pas hésitée à être mon promotrice et à encadré mon mémoire de fin d'étude malgré ses engagements et ses occupations. Merci pour la disponibilité qui m'accordé pour le suivre de ce travail pour les conseils avisés et le grand aide durant tout la période du travail

A mes Enseignants depuis mes premières années d'études, en particulier Mr. BELKASSAM et Md. KADRI, pour leurs conseils précieux.

A tous ceux que j'aime

ZEKKARI Nesrine

Dédicace

A ma très chère maman

*Sa tendresse, son amour et ses sacrifices qu'elle a toujours consentis pour moi.
Que dieu te procure santé et te garde pour moi afin que je puisse te comble à
mon tour.*

A mon très cher papa

*Son soutien, ses encouragements et son aide morale et financière tout au long de mon
cursus. Que dieu te préserve et te protège de tout mal.*

A mes très chères sœurs

Fatima, Wardia, Djamila, Turkia et en particulier ma petite sœur Khadidja.

A mes très chers frères

Chabane, Youcef et en particulier mon petit frère Abderrahmane.

Mes nièces et neveux

*A mes chères amies, Khadidja, Chahra, Nessrine, Salma, Berkahoum et
Assia. A toute personne de ma promotion, qui a me laissé dans ma
mémoire du bonheur, du sourire et de la joie en particulier : Asma, Fadhila,
Hoda, Hadjer et Meriem.*

*A mes enseignants un par un, à ma promotrice Dr BELHADJ, sa
disponibilité, sa compétence et ces conseils pour que cette thèse soit d'être parfaite.*

*A tous ceux que j'aime et tous ceux qui m'aiment, à tous ceux qui me sont chers, à
vous tous, je dédie ce modeste travail, du profond de mon cœur, qui vous exprime
ma gratitude éternelle et ma sincère estime.*

AMRANI Soumia

Sommaire

Remerciements.....	I
Dédicace.....	II
Dédicace.....	III
Dédicace.....	IV
Sommaire.....	V
Liste des tableaux.....	XII
Liste des figures.....	XIV
Liste des abréviations.....	XVII
Liste des unités.....	XXIII
Glossaire.....	XXIV
Introduction générale.....	1

Première partie: Etude bibliographique

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone

1. Données pharmaceutiques.....	2
1.1. Aspect du médicament.....	2
1.2. Propriétés physico-chimiques de Chlorhydrate d'Amiodarone.....	3
1.2. 1. Propriétés chimiques.....	3
1.2.2. Propriétés physiques.....	4
1.2.3. Cycle de vie de produit étudié et ses différents points de contrôle qualité.....	5
2. Données pharmacologiques.....	6
2.1. Composition du médicament.....	6
2.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	6

2.3. Propriétés pharmacodynamiques.....	7
2.3.1 Mécanisme d'action de Chlorhydrate de l'Amiodarone.....	7
2.3.2 Propriétés pharmacologiques.....	8
2.4. Indications thérapeutiques.....	8
2.5. Posologie et mode d'administration.....	9
2.6. Interactions médicamenteuses.....	10
2.7. Effets indésirables.....	10
2.8. Contres indications.....	11

Chapitre II: Chromatographie / Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

1. Généralité sur la chromatographie.....	12
1.1. Définition.....	12
1.2 .Principe.....	12
1.3. Classification des techniques chromatographiques.....	14
2. Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC).....	15
2.1 .Historique.....	15
2.2 .Principe.....	16
2.3. Mécanismes séparatifs de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) ...	17
2.3.1. Chromatographie de partage.....	17
2.3.2. Chromatographie d'exclusion.....	20
2.3.3. Chromatographie d'adsorption.....	20
2.3.4. Chromatographie échangeuses d'ions.....	22
2.3.5 .Chromatographie chirale.....	23
2.4 .Appareillage.....	24
2.4.1.Système de pompage	24

2.4.2 .Injecteurs.....	25
2.4.3. Colonne et phase stationnaire.....	26
2.4.4 .Phase mobile.....	29
2.4.5 .Détecteur.....	30
2.4.6 .Mode opératoire.....	32
2.5. Pic chromatographique.....	32
2.5.1. Grandeurs de rétention.....	33
2.5.2. Données chromatographiques.....	36
2.5.3. Paramètres de séparation.....	39
2.6 .La perte de charge dans une colonne.....	43
2.7. Le comportement d'un pic chromatographique.....	43
2.7.1. Facteur de symétrie A_s	44
2.7.2 .Facteur d'asymétrie (ou facteur de trainé t_f).....	44
2.8 .Test de conformité de système (TCS).....	45
2.8.1. Définition du test de conformité du système (TCS)	45
2.8.2. Période d'application du test	45
2.8.3. Les paramètres à vérifier pour l'évaluation d'un système chromatographique.....	46
3.9. Domaines d'application de la Chromatographie liquide haute performance (HPLC)....	47

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique

1. Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique.....	50
1.1. Paramètres liés à l'optimisation.....	50
1.1.1 .Augmentation de l'efficacité d'une colonne.....	50
1.1.2. Augmentation de la vitesse «v» de la phase mobile.....	52
1.1.3. Optimisation de la résolution R_s	54

1.1.4.Optimisation de la durée d'analyse.....	56
1.2.Paramètres les plus sensibles permettant une meilleure optimisation de la méthode d'analyse.....	57
1.2.1.Modification du pH de la phase mobile.....	57
1.2.2. Modification du polarité de la phase mobile.....	57
1.2.3 .Optimisation de la température.....	58
1.2.4. Limite de pression.....	58

Chapitre IV: Validation / Revalidation analytique

1. Validation.....	60
1.1. Définition.....	60
1.2 .Critères de validation.....	60
2. Revalidation.....	63
3. Ajustement des conditions opératoires en chromatographie.....	63

Deuxième partie: Expérimentation

Chapitre V: Données générales

1. Présentation du site de stage.....	67
2 .Organisation du Laboratoire National de Contrôle de Produits Pharmaceutiques.....	68
3. Problématique.....	69
4 .Objectif.....	70

Chapitre VI: Modes opératoires et résultats avant optimisation

1. Mode opératoire.....	71
-------------------------	----

1.1 . Matériel.....	71
1.2 .Réactifs.....	74
1.3. Méthode.....	78
1.3.1 .Conditions opératoires.....	78
1.3.2. Protocole de la méthode.....	79
1.3.2.1. Préparation de la phase mobile.....	79
1.3.2.2. Préparation des solutions standards.....	80
1.3.2.3 . Préparation de la solution d'échantillon.....	80
1.4. Vérification des paramètres de suitabilité (conformité du système).....	80
2. Résultats du dosage avant optimisation.....	81
3. Interprétation.....	82

Chapitre VII: Optimisation du facteur d'asymétrie du pic chromatographique

1. Essais réalisés.....	84
1.1. Modification de la longueur de la colonne.....	84
1.1.1 .Protocole.....	84
1.1.2. Résultats.....	84
1.1.3. Interprétation.....	85
1.2. Modification de débit de la phase mobile.....	85
1.2.1. Protocole.....	85
1.2.2.Résultat.....	86
1.2.3. Interprétation.....	87
1.3 .Modification du pH de la phase mobile.....	87
1.3.1 .Protocole.....	87

1.3.2 .Résultats.....	87
1.2.3 .Interprétation.....	89
1.4 .Modification du diamètre des particules de la phase stationnaire.....	90
1.4.1 .Protocole.....	90
1.4.2. Résultats.....	90
1.4.3. Interprétation.....	91
1.5 .Modification de proportion du solvant de la phase mobile.....	92
1.5.1 .Protocole.....	92
1.5.2. Résultats.....	92
1.5.3. Interprétation.....	93
1.6 .Ajout du solvant modificateur	94
1.6.1 .Protocole.....	94
1.6.2 .Résultats.....	94
1.6.3. Interprétation.....	95
1.7 .Utilisation de la colonne ODS1.....	96
1.7.1 .Protocole.....	96
1.7.2. Résultats.....	96
1.7.3 .Interprétation.....	97
2. Ajustement et revalidation.....	98
Conclusion générale.....	99
Résumé.....	100
Références bibliographiques.....	102

Liste des tableaux

Tableau 2.1: Différentes actions du Chlorhydrate d'Amiodarone.....	7
Tableau 2.2: Principales propriétés pharmacologiques de Chlorhydrates de l'Amiodarone.....	8
Tableau 2.3: Indications thérapeutiques du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les arythmies supra-ventriculaires et les arythmies ventriculaires.....	9
Tableau 2.4: Posologie et mode d'administration de Chlorhydrate d'Amiodarone.....	9
Tableau 2.5: Principales interactions médicamenteuses du Chlorhydrate d'Amiodarone et leurs conséquences sur l'organisme.....	10
Tableau 2.6: Principaux effets indésirables extra-cardiaques du Chlorhydrate d'Amiodarone.....	10
Tableau 2.7: Principaux contres indications du Chlorhydrate d'Amiodarone.....	11
Tableau 2.8 : Composition des phases mobile et stationnaire dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale.....	19
Tableau 2.9: Classification des solvants selon leur polarité et pouvoir d'élution dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale.....	19
Tableau 2.10: Détecteurs employés pour l'HPLC et leurs principes.....	31
Tableau 2.11: Paramètres de test de conformité du système (TCS).....	46
Tableau 2.12: Limites de paramètres du TCS selon les renseignements de l'USP et FDA.....	46
Tableau 2.13: Avantages et inconvénients de modification de L , v et dp	53
Tableau 3.14: Variations admises des paramètres selon l'United States pharmacopia.....	64
Tableau 3.15: Variations des paramètres de la phase mobile admises selon la Pharmacopée Européenne.....	65
Tableau 3.16: Variations des paramètres de la phase stationnaire et de la colonne admises selon la Pharmacopée Européenne.....	66

Tableau 3.17: Bulletin de contrôle microbiologique et de contrôle physico-chimique.....	77
Tableau 1.18 : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage par HPLC de produit étudié dans les comprimés dosés à 200 mg.....	78
Tableau 2.19 : Paramètres de suitabilité avant optimisation.....	78
Tableau 1.20 : Paramètres de suitabilité après l'utilisation d'une colonne avec L=25cm.....	85
Tableau 1.21 : Paramètres de suitabilité après l'utilisation d'un débit = 2.5ml/min.....	86
Tableau 1.22 : Paramètres de suitabilité après l'utilisation d'une phase mobile à pH=4.....	88
Tableau 1.23 : Paramètres de suitabilité après l'utilisation d'une phase stationnaire dont le diamètre des particules égale à 5µm	91
Tableau 1.24 : Paramètres de suitabilité après l'utilisation d'une phase mobile {KH ₂ PO ₄ à 0,1M-ACN (30/70: V/V)}.....	93
Tableau 1.25 : Paramètres de suitabilité après l'addition de la solution de Triéthylamine (TEA).....	95
Tableau 1.26 : Paramètres de suitabilité après l'utilisation d'une colonne de type ODS1.....	97
Tableau 2.27: Paramètres optimisés ajustable et les paramètres optimisés nécessitant une validation.....	98

Liste des figures

Figure 1.1: Comprimés du produit étudié à 200 mg.....	2
Figure 1.2: La structure chimique de Chlorhydrate d'Amiodarone.....	3
Figure 2.3: Spectre d'absorption UV du Chlorhydrate d'Amiodarone.....	4
Figure 1.4: Schéma du Cycle de vie du produit étudié et ses différents points de contrôle qualité.....	5
Figure 1.5: Classification des méthodes chromatographiques.....	14
Figure 2.6 : Principe de la chromatographie d'exclusion.....	20
Figure 2.7: Adsorption et désorption dans la chromatographie d'adsorption	21
Figure 2.8: Interactions entre soluté-solide adsorbant- éluant dans la chromatographie d'adsorption.....	21
Figure 2.9: Principe de la chromatographie échangeuse d'ions.....	22
Figure 2.10 : Principe et appareillage d'une chaîne d'HPLC.....	24
Figure 2.11: Fonctionnement du système de pompage en HPLC.....	25
Figure 2.12 : Schéma du fonctionnement de l'injecteur à boucle.....	26
Figure 2.13: Le triangle de SNYDER.....	30
Figure 2.14 : Principaux paramètres d'un chromatogramme.....	32
Figure 2.15: Chromatogramme illustrant le t_R , t'_R , t_M	34
Figure 2.16 : Chromatogramme et largeurs du pic chromatographique.....	36
Figure 2.17 : Illustration du modèle de plateaux théoriques.....	38
Figure 2.18 : Chromatogramme et résolution.....	39
Figure 2.19 : Exemples de séparation chromatographique de deux composés.....	40
Figure 2.20: Paramètres pour calculer la sélectivité.....	42

Figure 2.21 : Exemple d'une asymétrie de pic chromatographique.....	44
Figure 2.22 : Illustration de l'aspect qualitatif et quantitatif de l'HPLC.....	48
Figure 1.23 : L'effet de diamètre des particules remplissant la phase stationnaire sur N	51
Figure 1.24 : La courbe de Van Deemter.....	52
Figure 1.25 : Variation de R_s en fonction de α pour $K_2 = 5$ et $N = 10000$	54
Figure 1.26 : Variation du rapport $K'/1+K'$ en fonction de K'	55
Figure 1.27 : Table de miscibilité des solvants en Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	58
Figure 1.28 : Laboratoire national de contrôle qualité des produits pharmaceutiques.....	67
Figure 1.29 : Appareil d'HPLC.....	71
Figure 1.30 : Balances analytiques.....	72
Figure 1.31 : Bain ultrason.....	72
Figure 1.32 : pH-mètre.....	73
Figure 1.33 : Verreries.....	73
Figure 1.34 : Vials de 2ml.....	74
Figure 1.35 : Information relatives à l'emploi de l'acétonitrile.....	75
Figure 1.36 : Propriétés physico-chimique de l'acétonitrile.....	75
Figure 1.37 : Propriétés physicochimiques de potassium dihydrogénophosphate.....	76
Figure 1.38 : Information relatives à l'emploi du Triéthylamine.....	76
Figure 1.39 : Propriétés physico-chimique du Triéthylamine.....	77
Figure 1.40 : Colonne C18 de 25cm.....	78
Figure 2.41 : Chromatogramme de dosage du Chlorhydrate d'Amiodarone avant optimisation.....	81
Figure 2.42 : Colonne C18 de 15cm.....	84

Figure 2.43 : Chromatogramme avec utilisation d'une colonne de 15 cm.....	86
Figure 2.44 : Chromatogramme obtenu à partir d'un débit égale à 2,5 ml/min.....	88
Figure 2.45: Chromatogramme avec une phase mobile est de pH=4.....	90
Figure 2.46: Chromatogramme avec une phase stationnaire dont le diamètre des particules égale à 5 μm	93
Figure 2.47: Chromatogramme avec PM { KH_2PO_4 à 0,1 M-ACN (30/70 :v/v)}.....	95
Figure 2.48: Chromatogramme après ajout de Triéthylamine (TEA).....	97
Figure 2.49: Chromatogramme avec utilisation d'une colonne type ODS1.	97

Liste des abréviations

A : Aire du pic

A : Coefficient de diffusion turbulente

a : Distance entre le perpendiculaire abaissé du maximum du pic et le bord d'entrée du pic (mesurer à 5% de la hauteur du pic)

AC : Articles de conditionnement

ACN : Acétonitrile

ADME : Absorption ; Distribution ; Métabolisme ; Elimination

B : Coefficient de diffusion longitudinale

B : Base

B₀ : Perméabilité spécifique

B : Distance entre le perpendiculaire abaissé du maximum du pic et le bord de sortie du pic (mesurer à 5% de la hauteur du pic) .

BH⁺ : Base protonée

B : Récepteur β adrénergique

A : Sélectivité d'une colonne

α : Récepteur α adrénergique

As : Facteur d'asymétrie

C18 : Octadecyl

C8 : Octyl

°C : Degré Celsius

CCM : Chromatographie sur couche mince

CDER : Center for Drug Evaluation and Research

CG : Chromatographie Gazeuse

CGS : Chromatographie Gaz/Solide

CI : Contre-indication

CL : Chromatographie Liquide

CLL : Chromatographie Liquide/Liquide

CLS : Chromatographie Liquide/Solide

C_m : Concentration du soluté dans la phase mobile

C_p : Comprimé

C_s : Concentration du soluté dans la phase stationnaire

CPG : Chromatographie Phase Gazeuse

CPL : Chromatographie Phase Liquide

CPS : Chromatographie Phase Solide

CQ : Control Qualité

C.U : Coefficient de transfère de masse du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile

CYP3A4 : CytochromeP3A4

CYP2C8 : CytochromeP2C8

d : Distance entre le perpendiculaire abaissé du maximum du pic et le bord d'entré du pic au vingtième de sa hauteur

D.C.I : Dénomination Chimique Internationale

DEA : Deséthylamiodarone

ΔP : Perte de charge

D_m : Coefficient de distribution massique

d_p : Diamètre des particules

ECG : Electrocardiogramme

Φ : Facteur de résistance à l'écoulement

F : Debit

FDA : The United States Food and Drug Administration

H : Hauteur de plateau théorique.

h : Hauteur du pic

H₂O : L'eau

HEPT : Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique

h_{min} : Hauteur minimale

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

ICH : International Conférence on Harmonization

IR : Infrarouge

ISO : Organisation Internationale de Standardisation

K : Coefficient de distribution

K_c : Coefficient de distribution à l'équilibre

K_{D1} : Coefficient de dissociation du constituant 1

K_{D2} : Coefficient de dissociation du constituant 2

K₀ : Coefficient de partage

K₁ : Coefficient de distribution de l'espèce le plus retenue

K₂ : Coefficient de distribution de l'espèce le plus rapidement éluée

K' : Facteur de rétention ou de capacité

λ : Longueur d'onde

L : Longueur de la colonne

LNCPP : Laboratoire National de Control Qualité des Produits Pharmaceutiques

m : Masse

MP : Matière première

n : Nombre des valeurs individuelles

N : Nombre de plateaux théorique

N : Efficacité d'une colonne

ODS1 : Column has an Octadecyl Silane (C18) Stationary phase.

PA : Potentiel d'action

PA : Principe actif

Ph.Eur : Pharmacopée Européenne

pH : Potentiel d'hydrogène

PF : Produit fini

pKa : Fonction égale au moins le logarithme décimale de la constante d'acidité

PM : Phase mobile

PR : Période réfractaire

PS : Phase stationnaire

PSC : Phase Stationnaire Chirale

R : Rétention relative

rG : Rétention relative non ajustée

RP-HPLC : Reverse- phase High Performance Liquid Chromatography

Rs : Résolution

RSD : Relative Standard Déviation

S1 : Solution standard

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

Si-OH : Groupement silanol

Sr : Ecart type relative

SST : System suitability Tests

STD : Standard

σ : Ecart type = $\frac{1}{2}$ Largeur du pic à la hauteur des points d'inflexion, à 60,6% de la hauteur

6:Largeur du pic à mi-hauteur

T : Facteur de trainé

TCS : Test de conformité de système

TEA : Triéthylamine

Tf : Facteur de trainé

T₀ : Temps mort

t_M : Temps mort

t_R : Temps de rétention

t_{R1} : Temps de rétention du pic de référence (celui de la substance à examiner)

t_{R2} : Temps de rétention du pic considéré

t'_R : Temps de rétention réduit

tt : Temps de rétention ou distribution sur la ligne de base

U : Vitesse linéaire de la phase mobile

UFC : Union Forming Colony

USP : United States Pharmacopeia

UV : Ultraviolet

v : Débit de la phase mobile

V_M : Volume mort ou nulle

V₀ : Volume mort

V_{mort} : Volume mort

V_R : Volume de rétention

V_{opt} : Vitesse optimale

V_s : Volume de la phase stationnaire

W : Largeur du pic à la base

W_{0.05} : Largeur du pic au vingtième de sa hauteur

ω : Largeur du pic à la base

ω^{1/2} : Largeur de pic à mi-distance

ω_b : Largeur du pic à la base

ω_a : Largeur du pic à la base

ω_h : Largeur du pic à mi-hauteur

η : Viscosité de la phase mobile

y_i : Valeurs individuelles (Surface ou hauteur de pic ou rapport du surface pour méthode d'étalon).

Ȳ : Moyenne des valeurs individuelles

Liste des unités

% : pourcent

bar : Unité de mesure de la pression

cm : Centimètre

g : Gramme

Kg : Kilogramme

l : Litre

M : Concentration molaire

m : Mètre

µl : Microlitre

µm : Micromètre

µS : Micro seconde

mg : Milligramme

min : Minute

ml : Millilitre

mm : Millimètre

mol : Mole

nm : Nanomètre

Pa : Pascale.

ppm : Partie par million.

psi : Pound-force per square inch, unité de mesure de contrainte et de pression anglo-saxonne

Glossaire :

Arythmies: une anomalie qui affecte la fréquence cardiaque normale. En présence d'arythmie, le cœur a tendance à battre trop lentement (bradycardie), trop vite (tachycardie) ou de façon irrégulière.

Antiarythmiques : sont des substances qui modifient les propriétés électrophysiologiques cardiaques en agissant sur la cinétique trans membranaires des ions soit : directement (ex : inhibiteurs des canaux calciques ou sodiques), soit : indirectement (ex : bêtabloquants). . Donc ils agissent en réduisant l'automatisme et en modifiant la conduction des fibres myocardiques et /ou du tissu nodal .Ils tendent à rétablir la régularité du rythme cardiaque lorsque la naissance et la propagation des battements sont desynchronisée

Acide :est un composé (ion ou molécule) capable de libérer un ion H⁺.

Base : est un composé (ion ou molécule) capable de capter un ion H⁺.

Composé hydrophile : est un composé miscible à l'eau, aux solutions aqueuses, et aux milieux biologiques aqueux.

Composé lipophile : est un composé miscible aux substances huileuses.

Comprimés : sont définis à la pharmacopée européenne comme étant des préparations de consistance solide, contenant chacun une unité de prise ou plusieurs substances actives et obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules.

demi-vie plasmatique d'un médicament (T_{1/2}) : est le temps nécessaire pour que la concentration plasmatique du principe actif diminue de moitié, par exemple de 100 à 50 mg/L.

Diastéréoisomère :sont des molécules qui ont de même enchainement d'atome, mais ne sont ni superposables ni image l'une de l'autre dans un miroire .

Diffusion : est le processus par lequel des ions ou des molécules se déplacent à travers une solution d'une zone concentrée vers une zone plus diluée.

Eluant : est un solvant utilisé pour entraîner les constituants à travers une phase stationnaire.

Elution : est un processus au cours duquel des solutés sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile .

Enzyme : sont des molécules de masse molaire élevée qui catalyse des réactions dans les systèmes biologiques

Médicament :est un composé d'une substance active et de substance inerte convenablement à la voie d'administration, à laquelle il est acquis, appelée excipient.

Médicament générique : Un médicament générique est considéré comme essentiel similaire au médicament original, lorsqu'il a la même composition qualitative en principe(s) actif(s),

qu'il est sous la même forme pharmaceutique et que, lorsque nécessaire, la bioéquivalence avec le premier produit a été démontrée par les études appropriées de biodisponibilité.

Potentiel d'Hydrogene (pH) : correspond à la force d'acidité d'une solution aqueuse. Il a une valeur comprise entre 0 et 14.

Potentiel d'action: est un signal électrique unidirectionnel parcourant les axones des neurones, qui provoque la libération de neurotransmetteurs au niveau dendrite ou du corps cellulaire d'un neurone peut conduire à une dépolarisation de la membrane, qui sera d'autant plus importante que l'intensité du stimulus est grande. Un potentiel d'action comprend quatre phases :

-Au repos; les canaux tensiodépendants sont fermés

-Pendant la phase de dépolarisation, les canaux à sodium s'ouvrent

-Pendant la repolarisation, les canaux à sodium se ferment et les canaux à potassium s'ouvrent

-Pendant l'hyperpolarisation, les canaux à sodium sont fermés et les canaux à potassium toujours ouverts

Principe actif: c'est la substance responsable de l'effet pharmacologique du médicament

Tampons : sont des systèmes chimiques (couples d'acide et de base conjuguée) dont la propriété est de s'opposer aux variations du pH imposés à la solution (il stabilise le pH d'une solution).

Une gaussienne ou courbe d'erreur normale : est une courbe qui montre la distribution symétrique des données autour de la moyenne d'un nombre infini.

Traitement d'attaque : Traitement destiné à obtenir un effet rapide grâce à des doses élevées.

Traitement d'entretien : Traitement destiné à conserver le bénéfice d'un traitement d'attaque. La dose la plus faible permettant de maintenir l'efficacité est recherchée pour limiter les effets indésirables.

Iodation : réaction chimique qui consiste à remplacer un atome d'hydrogène par un atome d'iode.

Introduction générale

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Introduction générale

Le médicament n'est pas un produit comme les autres. Il est défini comme étant «**tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical, ou de restaurer, corriger ses fonctions organiques**» art 170 titre V produits pharmaceutiques et dispositifs médicaux, de la loi 85/05 relative à la protection et la promotion de la santé publique.

A ce titre, le médicament est rigoureusement encadré par de nombreux textes réglementaires afin de garantir les trois critères fondamentaux:

QUALITE, SECURITE, EFFECACITE.

Cependant, un contrôle rigoureux s'impose aux différents stades de fabrication : depuis la réception des matières premières jusqu'à la libération du produit fini conditionné. Une panoplie de tests physicochimiques et microbiologiques est réalisée pour chaque lot de médicament avant commercialisation, et ces nombreux essais effectués au niveau du laboratoire de contrôle qualité avec différentes méthodes d'analyse.

Dans ce contexte, nous avons effectué notre stage au niveau du Laboratoire National de contrôle qualité des produits pharmaceutiques LNCPP, où nous sommes particulièrement intéressés à la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) qui est une méthode de séparation de plus en plus utilisée en industrie pharmaceutique de par sa vitesse d'exécution, son grand pouvoir de résolution et son aptitude à analyser de manière qualitative et quantitative de faibles quantités d'échantillons. Les résultats sont faciles à lire et les tests aisément reproduits via le processus automatisé.

Aussi, afin de prouver que le système chromatographique fonctionne correctement au moment de l'analyse, des paramètres de conformité du système chromatographique (critères d'acceptation) doivent être définis et consignés dans la procédure analytique.

C'est ainsi que nous avons accompli le présent travail de recherche avec le souci constant qui consiste à optimiser un de ces critères d'acceptation qu'est le facteur de symétrie A_s dans la détermination de la teneur en Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés à 200mg de produit étudié .

Première partie :
Etude bibliographique

Chapitre I:

*Données générales sur le
Chlorhydrate d'Amiodarone en
comprimés dosés à 200 mg*

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimés dosés à 200mg

Parmi la panoplie des médicaments contrôlés au niveau du LNCPP, appartenant à différentes classes thérapeutiques, nous avons travaillé sur un anti-arythmique : le Chlorhydrate d'Amiodarone à 200mg qui a révélé une anomalie au niveau de son dosage par HPLC.

Les propriétés pharmaceutiques et pharmacologiques de ce médicament seront détaillées dans le présent chapitre.

1. Données pharmaceutiques

1.1 Aspect du médicament



Figure 1.1: Comprimés de produit étudié à 200 mg

Le produit étudié qui a comme dénomination commune internationale (DCI) Chlorhydrate d'Amiodarone : est un médicament générique commercialisé en Algérie avec deux dosages: 150 et 200 mg. Il s'agit d'un produit présenté sous forme d'un comprimé sécable.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimés dosés à 200mg

1.2 Propriétés physico-chimiques du Chlorhydrate d'Amiodarone

1.2. 1. Propriétés chimiques

Le Chlorhydrate d'Amiodarone est un dérivé benzofuranique di-iodés (forme avec le benzène la partie hydrophobe) contenant une chaîne alkyle avec une amine tertiaire di-éthylées (qui est la partie hydrophile) [6].

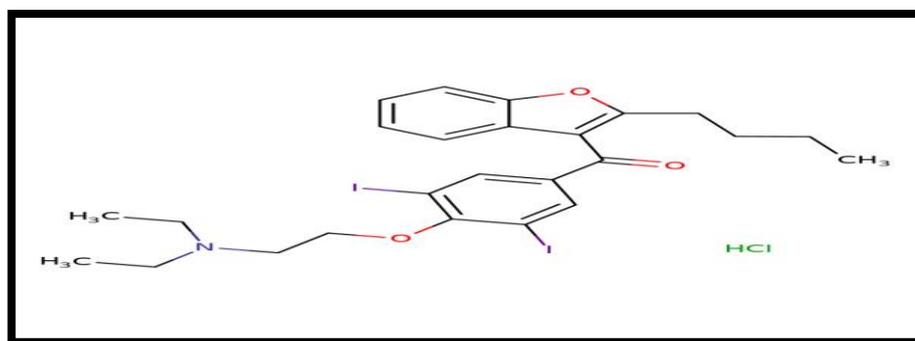


Figure 1.2: La structure chimique de Chlorhydrate d'Amiodarone [7].

- **Nom propre:** Chlorhydrate d'Amiodarone.
- **Nom chimique:** Chlorhydrate de (2-butylbenzofuran-3-yl) [4-[2-(diéthylamino)éthoxy]-3-5-di-iodophényl] méthanone[44].
- **Formule brute:** $C_{25}H_{29}I_2NO_3$ [44].
- **Masse molaire:** 645,32 g/mol.
- **Comportement acido-basique:** Le Chlorhydrate d'Amiodarone possède un pH voisin de 3,5 et un pKa égale à 6,5 ce qui signifie que si le pH est inférieur à pKa-2, il se comporte sous la forme R_3-NH^+ donc acide et si le pH est supérieur à pKa+2, il sera principalement sous forme R_3-N donc neutre [56][73].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimés dosés à 200 mg

1.2.2 Propriétés physiques

- **Solubilité:** Le Chlorhydrate d'Amiodarone est très peu soluble dans l'eau (0,07 g/100ml) ; facilement soluble dans le chlorure de méthylène ; soluble dans le méthanol et assez soluble dans l'alcool 96° (1,28 g/100ml)[19][44].
- **Température de fusion:** de 159 à 163°C [5] [19].
- **Spectre d'absorption UV:** Le Chlorhydrate d'Amiodarone est un composé qui absorbe à différentes longueurs d'ondes que l'on pourrait regrouper en un intervalle : $\lambda = [220 \text{ nm}-350\text{nm}]$ [56][73].

Une absorbance maximale est constatée à $\lambda \approx 245\text{nm}$ comme l'illustre le graphe ci-dessous :

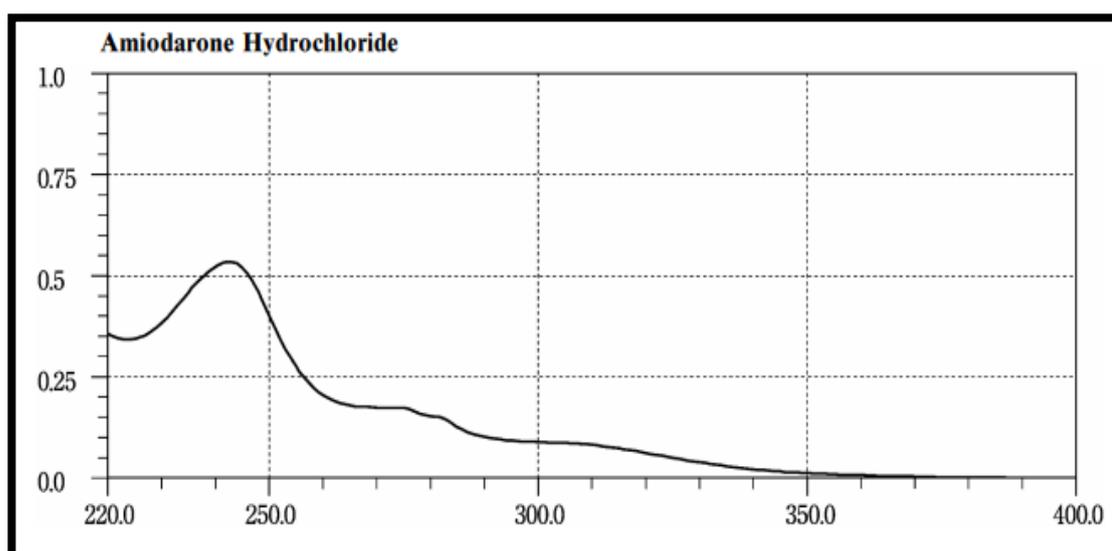


Figure 2.3: Spectre d'absorption UV du Chlorhydrate d'Amiodarone [56][73].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimés dosés à 200 mg

1.2.3 Cycle de vie du produit étudié et ses différents points de Contrôle qualité

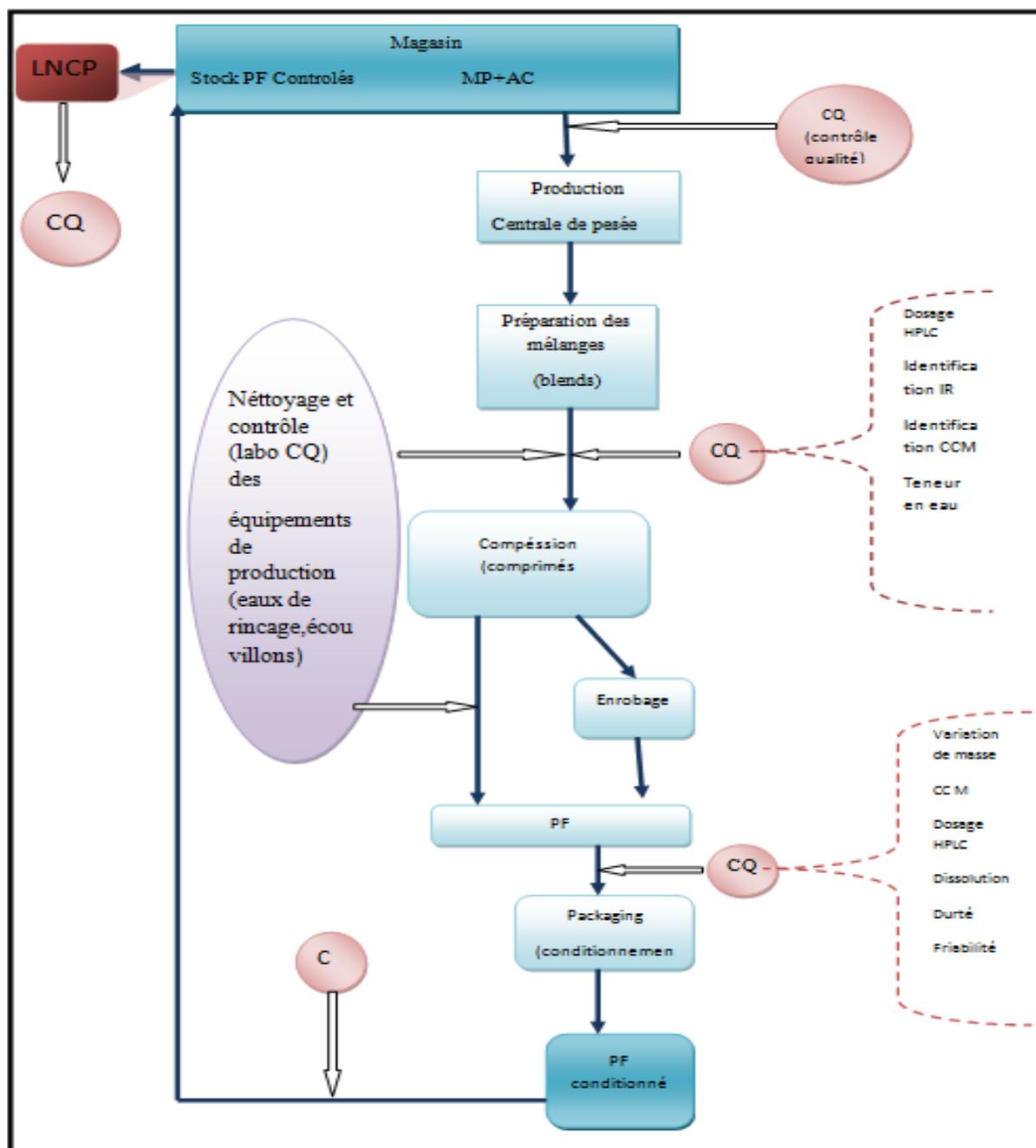


Figure 1.4: Schéma du cycle de vie du produit étudié et ses différents points de Contrôle qualité.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone comprimés dosés à 200 mg

2. Données pharmacologiques

2.1 Composition

- Principe actif : Chlorhydrate d'Amiodarone (DCI).....200 mg
- Excipients : Amidon de maïs, cellulose microcristalline, magnésium stéarate, lactose monohydrate.

2.2 Propriétés pharmacocinétiques

Suivant le système Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination(ADME), le sort de la molécule dans l'organisme au cours du temps est décrit comme suit:

*Absorption :

L'administration orale d'une dose unique fait l'objet d'une résorption lente et incomplète, l'effet de premier passage intestinal et hépatique semble être un facteur important dans la biodisponibilité générale de la substance qui peut varier de 33 à 65%. Le pic sérique est atteint dans les 3 à 12 heures suivant l'administration [5] [38] [22].

*Distribution :

Le Chlorhydrate d'Amiodarone est très lipophile, il est fortement lié aux protéines plasmatiques (PP) ce qui lui permet d'envahir le corps pour s'accumuler dans divers tissus notamment : le tissu adipeux, myocardique et musculaire. Sa demi-vie plasmatique moyenne est d'environ 53 jours (Quant au métabolite, elle est d'environ 61 jours) [5][38] [22].

*Métabolisme :

Il est essentiellement hépatique en faisant intervenir le cytochrome P450 avec ses iso-enzymes CYP3A4 et le CYP2C8 responsables de la N-deséthylation de Chlorhydrate d'Amiodarone en donnant naissance à une quinzaine de métabolites dont le plus intéressant est la monodéséthylamiodarone (DEA) qui est doué d'activité anti-arythmique. Sa concentration dans le myocarde est 3 à 4,5 fois plus élevée que celle du Chlorhydrate d'Amiodarone.

*Elimination :

La majeure fraction de l'iode que possède la molécule est éliminée dans les matières fécales alors qu'une faible portion de l'iode subira une desiodation au niveau tissulaire est évacuée dans les urines sous forme d'iodure [27]

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimés dosés à 200 mg

2.3 Propriétés pharmacodynamiques

2.3.a Mécanisme d'action du Chlorhydrate d'Amiodarone

L'action dominante de Chlorhydrate d'Amiodarone s'exerce au niveau de la phase 3 du potentiel d'action(PA), par un blocage des canaux potassiques, mais possède d'autres actions qui sont regroupées dans le tableau 2.1 [5] [43].

Tableau 2.1:Différentes actions de Chlorhydrate d'Amiodarone [5] [43]..

Siège de l'action	Effet	Conséquence
Phase 3 du PA	Blocage des canaux potassiques (freine la sortie des ions potassiques)	Une prolongation de la durée du PA et par conséquent un allongement de la période réfractaire (PR).
Phase 0,1 et 2 du PA	Réduction partielle du courant entrant du sodium et du calcium	Un allongement de la période réfractaire
Récepteurs α et β adrénergiques	Antagonisme non compétitif	Une diminution de résistances périphériques et une vasodilatation

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimés dosés à 200 mg

2.3.b Propriétés pharmacologiques

Les propriétés pharmacologiques de Chlorhydrate d'Amiodarone sont liées essentiellement à l'allongement de la phase 3 du potentiel d'action, elles sont également dues à l'action anti-sympathique de Chlorhydrate d'Amiodarone au niveau du système nerveux autonome [5] [34] [43] [22].

Donc, ces propriétés sont partagées en propriétés anti-arythmiques et anti-angineuses, qui sont représentées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2: Les principales propriétés pharmacologiques du Chlorhydrate d'Amiodarone.[34] [43] [22].

Propriétés anti-arythmiques	Propriétés anti-angineuses
-Un allongement de la durée du PA et de la PR au niveau de tous les tissus cardiaques (nœud sinusal, nœud auriculo-ventriculaire et ventriculaire,...etc.)	-Une diminution modérée des besoins en oxygène du myocarde.
-Un ralentissement de l'automatisme du nœud sinusal, et l'automatisme jonctionnel.	-Une vasodilatation artérielle.
-Un ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire (cet effet est le témoin d'un allongement de l'intervalle PR sur l'electrocardiogramme(ECG).	-Une diminution de la fréquence cardiaque et une action inotrope négative

2.4 Indications thérapeutiques

Le Chlorhydrate d'Amiodarone est un anti-arythmique efficace à la fois sur les troubles supra-ventriculaires et ventriculaires. Elle est utilisée par voie orale en dose de charge, dans le but de réduire les troubles de rythme [8] [34][22].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimés dosés à 200 mg

Cette molécule est indiquée dans la prévention et le traitement des arythmies pathologiques sévères, réfractaires aux autres traitements. Ses indications sont représentées dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3: Les indications thérapeutiques de Chlorhydrate d'Amiodarone dans les arythmies supra-ventriculaires et les arythmies ventriculaires [8] [34].

Arythmies supra-ventriculaires	Arythmies ventriculaires
-Tachycardie sinusale -Tachycardie dans un syndrome de Wolff-Parkinson-white -Extrasystoles auriculaires -Flutter et tachycardie auriculaire -Fibrillation auriculaire (paroxystique et permanente)	-Extrasystoles ventriculaires -Tachycardie ventriculaire -fibrillation ventriculaire

2.5 Posologie et mode d'administration

Le tableau 2.4 regroupe la posologie et le mode d'administration de Chlorhydrate d'Amiodarone [13] [18] [22].

Tableau 2.4 : Posologie et mode d'administration de Chlorhydrate d'Amiodarone [13] [18].

Traitement	Posologie
Traitement d'attaque	-Habituelle: 3 comprimé par jour, pendant 8 à 10 jours. -Dose élevée (4 à 5 comprimés par jour) sur de périodes brèves et sous surveillance électro-cardiaque.
Traitement d'entretien	-La dose minimale efficace est variable selon les patients (1cp par jour à 2 Cp par jour en une prise).

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimés dosés à 200 mg

2.6 Interactions médicamenteuses ¶

La prise simultanée d'autres médicaments peut changer l'effet du Chlorhydrate d'Amiodarone. Le tableau 2.5 renferme les principaux médicaments ayant un impact sur le devenir de la molécule dans l'organisme [8][40].

Tableau 2.5: Principales interactions médicamenteuses de Chlorhydrate d'Amiodarone et leurs conséquences sur l'organisme.[8][40].

Médicaments associés	Situation	Conséquences
Bétabloquants	Association déconseillé(AD).	Possibilité de troubles de l'automatisme et de conduction
Hypokaliémiants : diurétiques, corticoïdes, laxatifs stimulants	Association nécessitant une précaution d'emploi	Risque de torsade de pointe
Anticoagulants oraux	Association nécessitant une précaution d'emploi	Augmentation de l'effet de l'anticoagulant.

2.7 Effets indésirables :

Du fait de la nature iodée de Chlorhydrate d'Amiodarone ainsi que son accumulation tissulaire, elle induit de nombreux effets secondaires cardiaques et extracardiaques, comme le montre le tableau 2.6 [5][8][22]

Tableau 2.6:Les principaux effets indésirables extracardiaques de Chlorhydrate

Compartiment atteint	Effets indésirables
Cutané	Photosensibilisation, pigmentation cutanée.
Endocrinien	Hypothyroïdie, hyperthyroïdie
Pulmonaire	Pneumopathie interstitielle diffuse
Système nerveux	Symptômes extrapyramidaux, neuropathie périphériques sensitive, motrice ou mixtes
Hépatobiliaire	Elévation des transaminases sériques

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre I: Données générales sur le Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimés dosés à 200 mg

2.8 Contres indications

Les contre-indications de Chlorhydrate d'Amiodarone sont expliquées par ses propriétés pharmacologiques et ses effets indésirables. Le tableau 2.7 ci-dessous montre les principaux contres indications de ce médicament [5] [8] [40] [22].

Tableau 2.7 : Les principales contre-indications de Chlorhydrate d'Amiodarone.

Origines	Pathologie
Cardiovasculaires	Bradycardie sinusale Bloc sino-auriculaire Trouble de la conduction auriculo-ventriculaire sévère non appareillé Association à des médicaments donnant une torsade de pointe
Endocriniennes	Dysthyroidie soit une hyperthyroïdie (CI absolue) ou une hypothyroïdie (CI relative)
Immunologiques	Hypersensibilité à l'iode
Broncho-pulmonaires	Fibrose pulmonaire

On conclut que certaines informations recueillies concernant le produit étudié 200mg se sont avérées essentielles dans l'accomplissement de notre travail : Générique présenté sous forme de comprimés sécables dont le PA (Chlorhydrate d'Amiodarone) est une base faible polaire, très soluble dans le méthanol et qui absorbe dans l'UV.

Divers tests physicochimiques et microbiologiques sont réalisés dans le cadre de son contrôle qualité. Parmi ces tests : la détermination de la teneur en Chlorhydrate d'Amiodarone par HPLC. La parfaite maîtrise de cette méthode d'analyse est fondamentale pour la réalisation de notre travail et fera l'objet du chapitre suivant.

Chapitre II:

*Chromatographie/chromatographie
liquide haute performance(HPLC)*

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie a pris une place considérable dans les laboratoires d'analyse depuis son invention il y a plus de 100 ans. Elle compte plusieurs types classés selon la nature des phases stationnaire et mobile dont l'HPLC ; méthode analytique qui, de part sa rapidité et sa haute résolution, a révolutionné le contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique. Une ample description de cette méthode séparative sera développée dans ce chapitre.

1. Généralités sur la chromatographie

1.1 Définition

La chromatographie est une technique de séparation mais également d'identification et de quantification des constituants d'un mélange, elle permet une séparation en un temps relativement court [16].

1.2 Principe

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique basée sur la séparation des différents constituants d'un mélange, et ce par entraînement, à des vitesses différentes, au moyen d'une phase mobile (liquide ou gazeuse), le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixée) [16].

La séparation chromatographique se fait grâce à la répartition sélective des constituants entre la phase stationnaire et la phase mobile, selon la technique chromatographique mise en jeu[7][16]. La séparation des composants entraînés par la phase mobile, peut résulter des phénomènes d'adsorption et de désorption successifs sur la phase stationnaire, de la distribution de masse (partage), d'échange d'ions, etc., des différences de propriétés physiques (taille des particules, porosité, surface spécifique...) et de propriétés chimiques (interactions intermoléculaires, comme les liaisons hydrogènes, liaisons de Vander Waals...) qui sont à l'origine de cette répartition différente des composants d'un mélange dans chacune des deux phases non miscibles[7][44].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

ChapitreII: Chromatographie/chromatographie liquide haute

performance(HPLC)

Ce phénomène de séparation chromatographique est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre; ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier. A ce stade, le rapport des concentrations est égal au rapport des répartitions dans les deux phases ou coefficient de partage K [7][21].

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

- C_s = concentration dans la phase stationnaire
- C_m = concentration dans la phase mobile [7].

Plus K est grand, plus le composé est fortement retenu dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement.

La valeur de K dépend de :

- La structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des phases ;
- La nature de la phase stationnaire qui est un adsorbant ou un solvant pour chacun des composés ;
- La phase mobile, seulement si elle est un liquide, et donc un solvant pour chacun des composés ;
- La température qui affecte les pressions de vapeur et les solubilités [17][20][21].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance (HPLC)

1.3 Classification des techniques chromatographiques

La chromatographie analytique est utilisée pour identifier ou doser les composés chimiques d'un mélange et apprécier leurs concentrations.

On peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation, comme le montre le schéma ci-dessous [7] [30] [36].

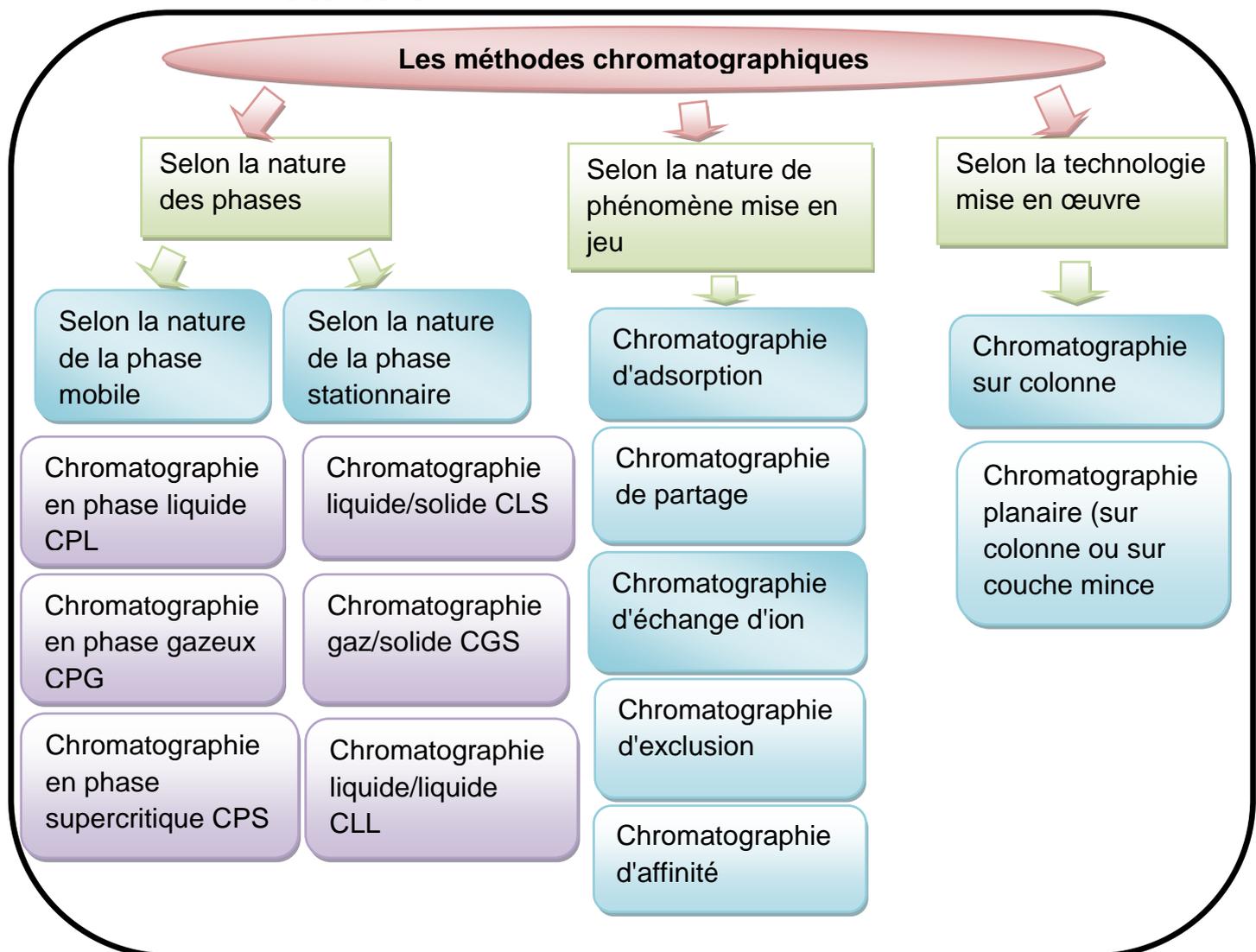


Figure 1.5: Classification des méthodes chromatographiques. [7][30][36].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance (HPLC)

2. Chromatographie en phase Liquide Haute Performance

2.1 Historique :

On situe à 1958 le début de la chromatographie en phase liquide moderne avec l'introduction de l'analyse « automatique » des acides aminés. Avant cette période, la chromatographie en phase liquide sur colonne (CL), bien qu'étant la plus ancienne des méthodes chromatographiques a été relativement peu utilisée, en raison principalement, de sa lenteur et de l'absence de détecteurs [11][49][54].

C'est suite à cela que la chromatographie en phase liquide sous haute pression (HPLC) a émergée après les fructueux travaux du docteur Giddings sur la hauteur équivalente à un plateau théorique. Il a démontré l'influence bénéfique de la haute pression et du diamètre des particules sur la résolution et la vitesse d'analyse et a œuvré pour le développement de cette technique (cf. à son ouvrage Dynamics of chromatography), jusqu'à ce que Scott (OakRidge National Laboratory) a obtenu de très bonnes résolutions en séparant plusieurs centaines de composés différents par échange d'ions sous haute pression . Cependant, ce n'est véritablement qu'en 1969, après le 5e Symposium International « Advance in Chromatography », que la chromatographie en phase liquide sous haute pression s'est véritablement développée [11].

En effet, c'est grâce à ce nouveau procédé, ainsi qu'aux nouvelles technologies (notamment le traitement par ordinateur) que la chromatographie en phase liquide sur colonne a atteint et dépassé l'efficacité de la chromatographie en phase gazeuse [11].

Cette chromatographie en phase liquide sous haute pression, ou haute performance (HPLC) est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces infimes de produits présents dans un mélange donné [11][51].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

2.2 Principe

La chromatographie en phase liquide sous haute performance est une méthode de séparation qui fait sensiblement appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants liquides constituant la phase mobile et une colonne remplie avec une phase stationnaire [11].

Cependant, au lieu que le solvant passe à travers la colonne sous le seul effet de la force de gravité prenant plus de temps pour éluer, en HPLC la durée d'élution est plus courte et est obtenue par l'application d'une pression élevée de l'ordre de 100 bars grâce à une pompe qui maintient constant le débit du liquide. La méthode est hautement automatisée et extrêmement sensible [11][49].

Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (liquide) que l'on appelle la phase mobile. Elles interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec un support (ou matrice) fixe (un solide ou un liquide fixé) que l'on appelle la phase stationnaire de fine granulométrie. Cette caractéristique de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants [11].

En effet, pour un même volume de phase stationnaire, la surface d'échange augmente si les « grains » qui la composent sont du diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits, donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas)[11].

La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance » [11].

Il y a donc une distribution ou partition des composants entre ces deux types de phases. Le flux du fluide vecteur étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue des différentes molécules sur le support fixe, qui va les séparer les unes des autres [11].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

Ainsi, sous certaines conditions dynamiques chaque composant du mélange atteint un équilibre de distribution en fonction de son affinité pour les deux phases et /ou de sa taille moléculaire. Il en résulte le déplacement des composés à différentes vitesses et c'est le détecteur placé à la sortie de la colonne, couplé à un enregistreur qui permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme [12].

En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence de la phase mobile seule, par la suite; au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic [12].

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permettent de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté [12].

2.3 Mécanismes séparatifs de la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC)

2.3.1 Chromatographie de partage

La séparation dépend des différences de solubilité des solutés dans la phase mobile et des différentes interactions des solutés avec les groupements organiques greffés sur la phase stationnaire. L'affinité de chaque constituant pour la phase stationnaire dépend de sa solubilité dans cette phase et de sa polarité. Les forces qui entrent en jeu sont donc les forces de Vander Waals, les ponts hydrogène... etc. C'est la technique de chromatographie liquide la plus utilisée, elle fonctionne donc par partage de solutés entre deux phases non miscibles. Ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de masses molaires inférieures à 3000g/mol (composés non-ioniques).

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

Il existe deux types de chromatographie de partage selon la polarité des phases stationnaires et mobiles[36][49]:

1) Chromatographie de partage sur phase normale

La phase normale est constituée du gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire [49]. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête [17][20].

L'inconvénient d'une telle phase, est la détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations [20].

2) Chromatographie de partage sur phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}) [16]. Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (Acétonitrile (ACN), Méthanol, H_2O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier [2] [20] [49].

Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante [20].

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales [20].

Ainsi, avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution).On peut en mélangeant plusieurs solvants , ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile[20].

Le tableau ci-dessous présente quelques exemples de la composition des phases mobiles et stationnaires dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale :

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

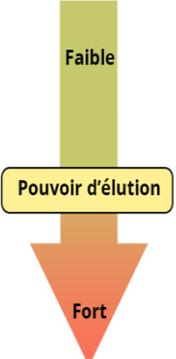
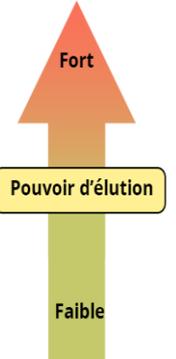
Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance

Tableau 2.8: Composition des phases mobiles et stationnaires dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale [20].

Phases	Phase inversé	Phase normale (classique)
Phase stationnaire	Non polaire ex. - silice greffée par une chaîne alkyle ou phényle	Polaire ex. - C ₃ H ₆ NH ₂ - C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂ - diol
Phase mobile	Polaire ex. - eau - méthanol - acétonitrile - tétrahydrofurane	Non polaire ex. - n-hexane - chloroforme - éther

Le pouvoir d'éluion des solvants diffère selon le type de chromatographie de partage (en phase inverse ou en phase normale), comme l'illustre le tableau suivant :

Tableau 2.9 : Classification des solvants selon leur polarité et leur pouvoir d'éluion dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale [53][55].

Phase stationnaire polaire	Solvants classés par polarité croissante	Phase stationnaire apolaire
	Hexane Toluène Trichloroéthane Dichlorométhane Éther Acétate d'éthyle Acétonitrile Méthanol Eau	

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

2.3.2 Chromatographie d'exclusion

Ce type de chromatographie est encore appelé : tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel.

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille (leur volume hydrodynamique), de leur forme et poids moléculaire. Elle est notamment utilisée pour évaluer la distribution des volumes hydrodynamiques dans un échantillon de polymères.

On utilise pour cela des granules de gel poreux [49]. Les molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car induites dans le gel, leur migration est freinée [58]. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse de leurs masses moléculaires comme l'illustre la figure suivante:

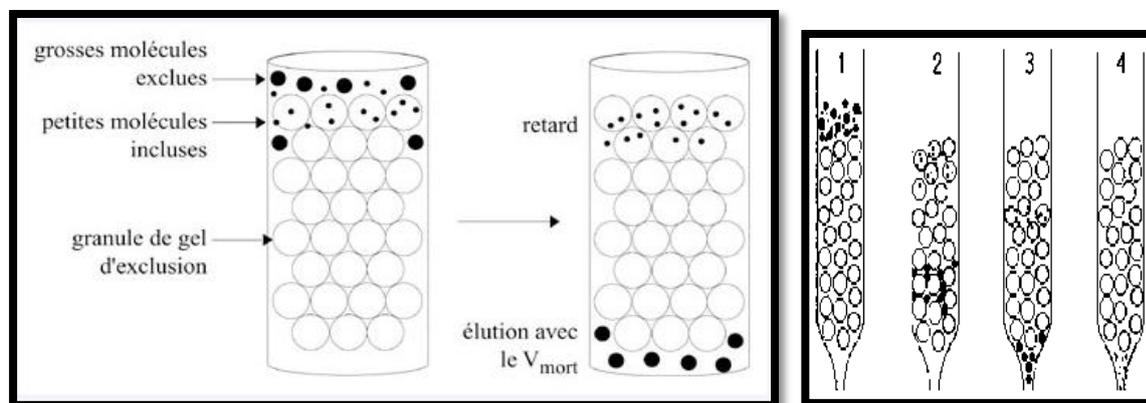


Figure 2.6 : Principe de la chromatographie d'exclusion [59].

2.3.3 Chromatographie d'adsorption

C'est la première chromatographie réalisée : séparation des pigments végétaux par adsorption sur de la craie [49]. Cette chromatographie est basée sur la mise en jeu d'un phénomène physico-chimique : l'adsorption qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide sur une surface solide [20].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

Ce phénomène fait intervenir des forces complexes entre le soluté et l'adsorbant : forces électrostatiques, forces inductives, forces de liaisons hydrogènes, forces de transfert de charges et autres. Mais pour que cette adsorption soit utilisable à des fins séparatives, il faut que cette fixation soit réversible comme l'illustre la **figure 2.8** ci-dessous. La désorption consiste alors à remettre, à l'aide d'un éluant approprié, la substance en solution par rupture des liaisons précédentes. Des relations d'équilibre règlent les interactions réciproques [20].

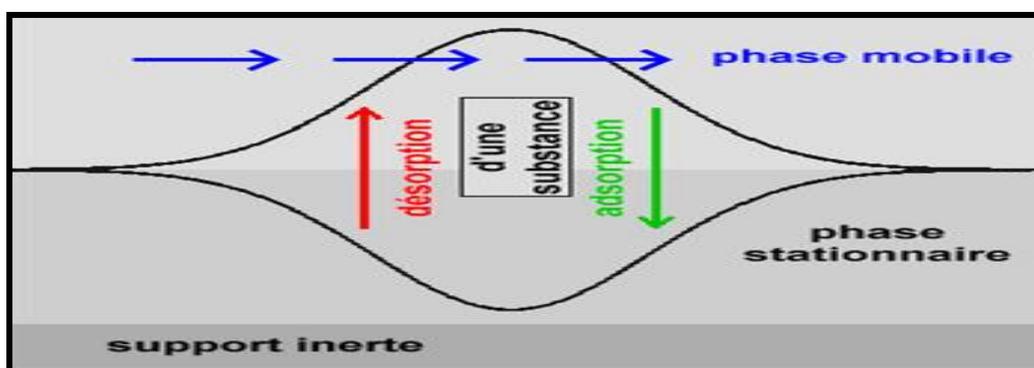


Figure 2.7: Adsorption et désorption dans la chromatographie d'adsorption [20].

Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation [37].

Le schéma ci-après résume les interactions entre le soluté, le solide adsorbant et l'éluant:

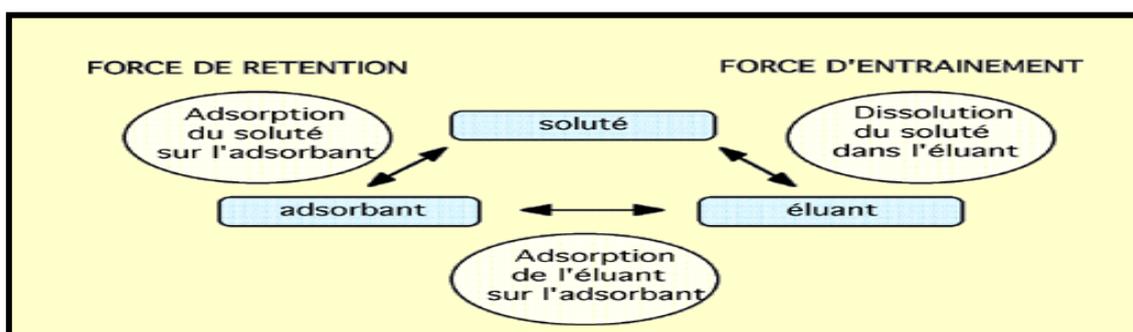


Figure 2.8 : Interactions entre soluté-solide adsorbant- éluant dans la chromatographie d'adsorption [37].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance (HPLC)

2.3.4 Chromatographie échangeuse d'ions

Appelée chromatographie à ions ou chromatographie échangeuse d'ions, il s'agit d'un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement (ionique) d'un mélange de molécules chargées (liquide). Pour cela, on fait passer le mélange sur une phase stationnaire chargée, déjà associée à des ions connus. Ces ions sont remplacés par les ions/molécules chargées du mélange à séparer. Elle est basée sur l'affinité que les ions en solution ont pour les ions de charge opposée de la phase stationnaire. Cette phase stationnaire est généralement une résine sur laquelle sont liés chimiquement des groupements ioniques. La phase mobile est une solution aqueuse tamponnée dans laquelle se trouvent les ions possédant les charges opposées à celles de la phase stationnaire. La rétention sur la colonne est dictée par la compétition qui existe entre le soluté et le contre-ion pour le site ionique. C'est une technique chromatographique couramment utilisée en chimie analytique, notamment pour le contrôle de la qualité de l'eau [11] [30].

L'image ci-dessous **Figure 2.9** illustre le principe de la chromatographie échangeuse d'ions :

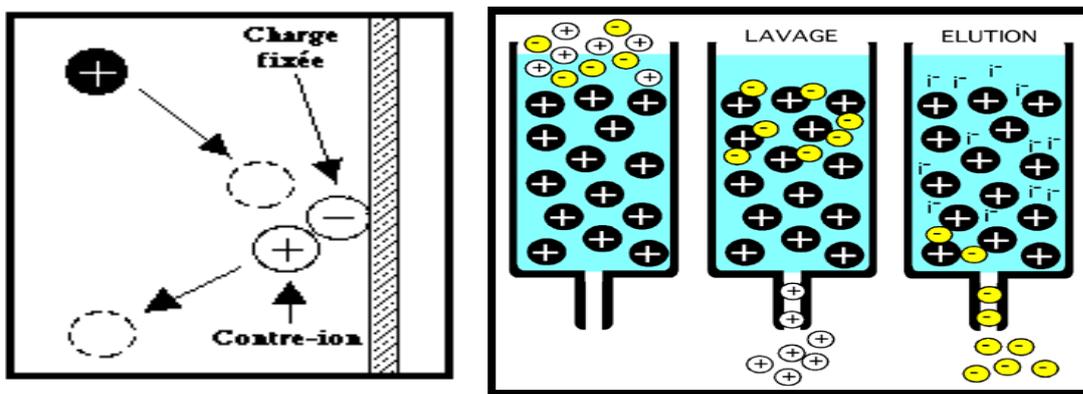


Figure 2.9: Principe de la chromatographie échangeuse d'ions [33].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

2.3.5 Chromatographie chirale

La chromatographie chirale est une technique très importante pour l'étude des molécules chirales grâce à la séparation analytique des énantiomères [58].

Elle permet au niveau analytique de mesurer des excès énantiomériques, et au niveau préparatif d'isoler des énantiomères purs [58].

Elle consiste en la formation de liaisons non covalentes entre les énantiomères du substrat et l'absorbant chromatographique chiral donnant des complexes diastéréoisomères ayant des affinités de liaisons différentes[58].

Dans cette technique, le mélange racémique à séparer est introduit et va interagir avec la phase stationnaire chirale (PSC). L'obtention de la séparation des énantiomères passe par la formation réversible de complexes diastéréoisomères dans la colonne de chromatographie (par liaison de van Der Waals entre les solutés que l'on veut séparer et le sélecteur chiral).

L'intérêt est que les complexes diastéréoisomères ainsi formés possèdent des propriétés physiques différentes ; ainsi l'un des isomères sera plus accroché que l'autre et migrera donc plus lentement, permettant leur séparation physique [58].

A l'heure actuelle, parmi les nombreuses méthodes de discrimination chirale, l'HPLC représente une technique de choix pour la purification et la quantification d'énantiomères.

En effet, outre le fait qu'elle allie à la fois rapidité, efficacité et sensibilité, elle permet également la séparation de composés chiraux sur des phases stationnaires chirales ou après addition de réactifs chiraux à la phase mobile [55] [58].

2.4 Appareillage:

En raison des pressions élevées qui doivent être appliquées pour assurer des débits raisonnables et de l'utilisation de supports dont le diamètre particulaire est de l'ordre de 2 à

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

10 μm , l'appareillage requis pour cette méthode d'analyse est ainsi nécessairement plus sophistiqué et plus coûteux que celui utilisé pour d'autres méthodes chromatographiques [49].

L'appareillage se compose d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermo statée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur) [49].

La phase mobile, délivrée à partir d'un ou de plusieurs réservoirs, circule à travers la colonne, généralement à débit constant puis passe à travers le détecteur [49].

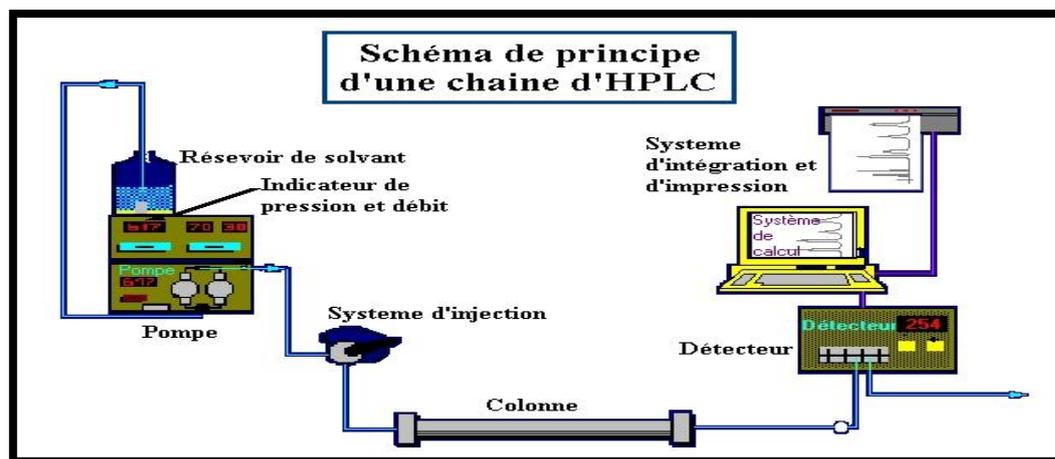


Figure 2.11 : Principe et appareillage d'une chaîne d'HPLC [15].

2.4.1 Système de pompage

Les systèmes de pompage pour l'HPLC doivent fournir la phase mobile à un débit constant. Il convient de limiter autant que possible les fluctuations de pression. Les tubes et raccords doivent pouvoir résister aux pressions développées par la pompe [3] [49].

Les pompes peuvent être équipées d'un dispositif de purge qui permet de chasser les bulles d'air emprisonnées ; leur rôle est donc double :

- Permettre le maintien d'un débit constant quelles que soient la pression et la variation de composition de la phase mobile ;
- Obtenir un débit suffisant jusqu'à 10mL/min sans perte d'exactitude et de reproductibilité [3] [49].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

Les systèmes pilotés par microprocesseurs sont capables de délivrer avec précision une phase mobile de composition constante (élution isocratique) ou variable (gradient d'élution), selon un programme défini pour les chromatographies à gradient d'élution [20] [49].

Il existe des systèmes de pompage qui délivrent le(s) solvant(s) à partir de plusieurs réservoirs, le mélange pouvant être effectué soit en amont (basse-pression) soit en aval (haute-pression) de la (des) pompe (s) [20].

Actuellement les paramètres d'une pompe sont : Débit : 0,01 à 10 ml/min, Stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion), Pression maximale > 350 bars [17][49].

Voici un schéma illustrant le fonctionnement de la pompe en HPLC :

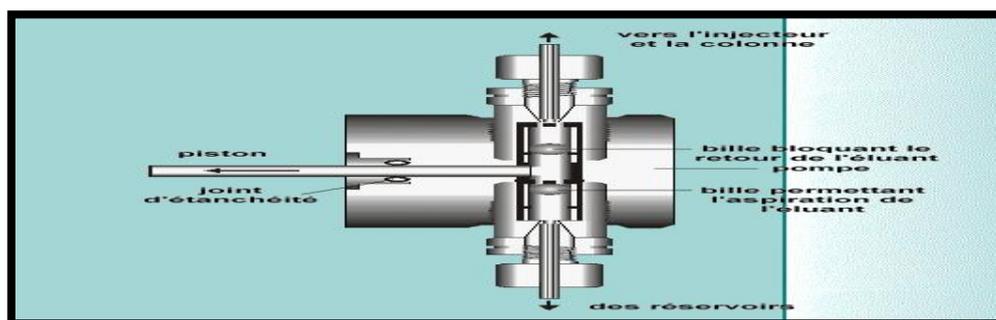


Figure 2.11: Fonctionnement du système de pompage en HPLC [20].

2.4.2 Injecteurs

La solution à examiner est introduite dans la phase mobile qui circule en tête de colonne, ou à proximité de celle-ci, à l'aide d'un système d'injection conçu pour fonctionner à pression élevée. L'injection doit se faire de manière très rapide afin de perturber le moins longtemps possible le régime de circulation du solvant. On doit injecter rapidement un volume précis sans arrêter l'écoulement du solvant à un endroit où règne une pression élevée [20].

Les injecteurs peuvent être à boucle fixe ou à volume variable, à fonctionnement manuel ou pilotés par un échantillonneur automatique. Le remplissage partiel des boucles manuellement, peut entraîner une moindre fidélité du volume injecté [20] [49].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance (HPLC)

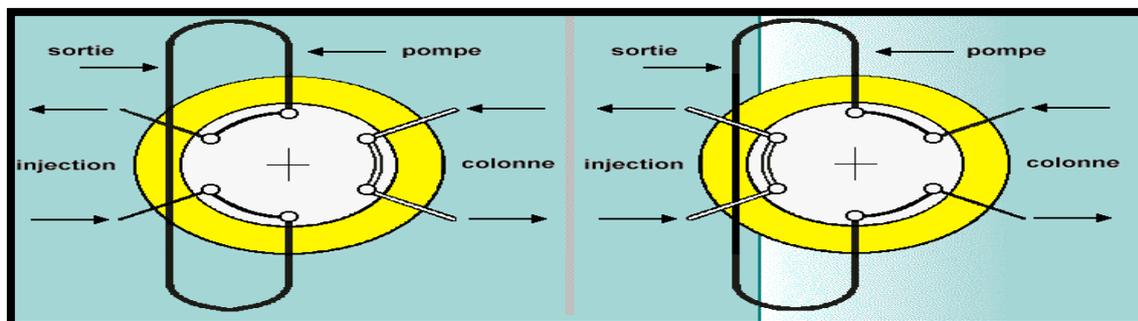


Figure 2.12 : Schéma du fonctionnement de l'injecteur à boucle.

Injecteur à boucle : À gauche, le remplissage de la boucle. À droite, l'injection dans la colonne [20] [49].

2.4.3 Colonne et phase stationnaire

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés en HPLC, notamment :

- De la silice, de l'alumine ou du graphite poreux, utilisés en chromatographie en polarité de phase normale, où la séparation repose sur une adsorption différentielle et/ou une distribution de masse [44] ;
- Des résines ou polymères à groupement acides ou basiques utilisés en chromatographie à échange d'ions, où la séparation repose sur la compétition entre les ions à séparer et ceux de la phase mobile [44] ;
- De la silice ou des polymères poreux utilisés en chromatographie d'exclusion où la séparation repose sur les différences de volumes entre molécules, ce qui correspond à une exclusion stérique [44] ;
- Divers supports chimiquement modifiés préparés à partir de polymères de silice utilisés en HPLC en polarité de phase inversée, où la séparation repose

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

- principalement sur le partage des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire [44].
- Des phases stationnaires chimiquement modifiées spéciales, tels que des dérivés de la cellulose ou de l'amylose, des protéines ou des peptides, des cyclodextrines... etc pour la séparation des énantiomères (chromatographie chirale) [44].

La surface du support (par exemple les groupes silanols de la silice) est mise en présence de différents réactifs de la famille des silanes, avec lesquels elle réagit en formant par liaison covalente, des dérivés silylés qui occupent un nombre variable de sites actifs de la surface du support [14].

La nature de la phase greffée est un paramètre déterminant pour les propriétés de séparation du système chromatographique [14].

Les phases greffées les plus couramment utilisées sont :

-Octyl = Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃	C8
-Octadécyl = Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	C18
-Phényl = Si-(CH ₂) _n -C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
-Cyanopropyl = Si-(CH ₂) ₃ -CN	CN
-Aminopropyl = Si-(CH ₂) ₃ -NH ₂	NH ₂

Les colonnes en phase inversée à base de silice sont considérées comme stables pour les phases mobiles de pH apparent compris entre 2 et 8 [14].

La silice utilisée pour les colonnes en phase inversée est une silice amorphe et poreuse, elle est utilisée sous forme de granules ou de microparticules régulières poreuses préparées par le procédé sol-gel. La réactivité de la silice est essentiellement gouvernée par la nature des groupements présents à sa surface parmi lesquels: **les groupements silanols (Si-OH) et les groupements siloxanes** [14].

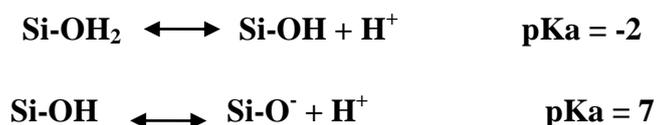
Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

- **les groupements silanols (Si-OH):**

Elles conditionnent la réactivité de la silice .Ils participent aux processus de rétention par l'adsorption, site d'échange d'ion et par une influence de la solvation sélective de la région Interface : trois types de groupements silanols (silanols libres ou isolés, silanol vicinaux ou ponts et silanols géminaux)[3] [14].

Les groupements silanols ont un caractère amphotère résumé par les deux équations ci-dessous [14] :



- **Les groupements siloxanes**

Ils sont générés par dihydroxylation à haute température (environ 1000C°) et cela se fait par une condensation de deux groupements silanols voisins avec élimination d'eau.

Du fait de leur caractère hydrophobe et leur faible réactivité, ces groupements sont très peu impliqués dans la chimie de surface en solution aqueuse [14].

En chromatographie analytique la taille des particules constituant les phases stationnaires les plus souvent utilisées est comprise entre 3-10µm .Elles sont en acier inoxydable, et sont de longueur et de diamètre intérieur variables [44].

La température de la phase mobile et de la colonne doit être maintenue constante pendant toute la durée de l'analyse. La plupart des séparations sont effectuées à température ambiante, mais il est possible de chauffer les colonnes pour obtenir une efficacité supérieure [44].

Il est toutefois recommandé de ne pas dépasser 60°C, sous peine de dégradation de la phase stationnaire ou d'altération de la composition de la phase mobile [44].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

2.4.4 Phase mobile

Pour la chromatographie en phase normale, les solvants utilisés sont de faible polarité. Un contrôle strict de la présence d'eau dans la phase mobile est nécessaire pour obtenir des résultats reproductibles [44].

Pour l'HPLC en phase inversée, on utilise des phases mobiles aqueuses avec ou sans modifiants organiques. Les composants de la phase mobile sont généralement filtrés pour éliminer les particules de taille supérieure à 0,45 µm. Les phases mobiles à plusieurs composants sont préparées par mesure de volumes requis (à moins que les proportions ne soient spécifiées en masse) pour chaque composant, puis par mélange des différents composants [44].

Une autre méthode possible consiste à délivrer les solvants au moyen de pompes individuelles commandées par des vannes à débit proportionnant [44].

Les solvants sont normalement dégazés avant le pompage, par passage d'un courant d'hélium, sonication ou traitement en ligne par des modules membranes/vide, pour éviter la formation de bulles de gaz dans la cellule de détection [44].

Les solvants utilisés pour préparer la phase mobile sont normalement exempts d'agents stabilisants, et transparents à la longueur d'onde de détection si on utilise un détecteur UV haute pureté, non corrosive et de faible viscosité [17][44].

Les solvants et autres composants utilisés doivent être de qualité appropriée.

La sélectivité du solvant est basée sur le triangle de Snyder, qui guide le choix du solvant ou des solvants à choisir ainsi que la phase stationnaire pour optimiser la séparation de l'analyte. Chaque apex du triangle représente une caractéristique d'un solvant, soit accepteur de proton, donneur de proton ou ayant un dipôle. Les solvants sont classés dans le triangle, de façon à les catégoriser selon les interactions possibles du solvant avec l'analyte [35].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

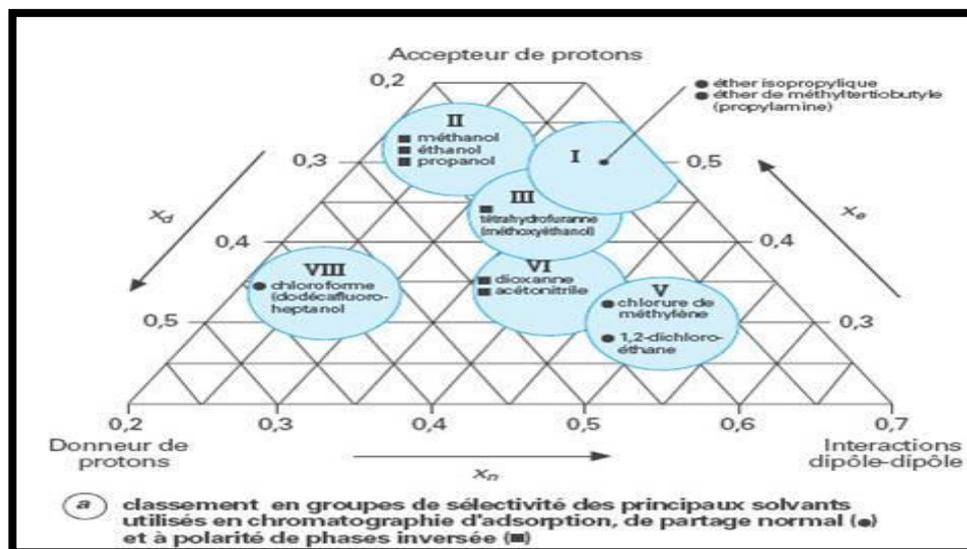


Figure 2.13: Le triangle de SNYDER [76].

L'ajustement du pH, s'il y a lieu doit être exclusivement effectué sur le composant aqueux de la phase mobile et non sur le mélange [32] [44].

Si des solutions tampons sont utilisées, il convient de rincer soigneusement le système avec un mélange d'eau et du modifiant organique de la phase mobile (5% V/V) une fois la chromatographie terminée, afin d'éviter la cristallisation des sels [35] [44].

Les phases mobiles peuvent contenir des additifs, comme par exemple un contre-ion dans le cas d'une chromatographie à appariement d'ions, ou un sélecteur chirale dans le cas d'une chromatographie avec phase stationnaire achirale [35] [44].

2.4.5 Détecteur

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un intégrateur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. Il dirige sur l'intégrateur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé, il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Il existe deux types de détecteurs :

- Le premier est basé sur les propriétés générales (solvant + soluté); ex: indice de réfraction, conductivité, constante diélectrique,...
- Le second est basé sur les propriétés des solutés ; ex: UV, polarographie, radioactivité,...[36].

Les différents détecteurs sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2.10 : Les détecteurs employés pour l'HPLC et leurs principes [20] [36][51].

Détecteur	Principe
Spectroscopie dans l'ultraviolet et le visible	Consiste à mesurer l'absorbance absolue d'un soluté.
Fluorimétrie	Consiste à mesurer l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette.
Réfractométrie	Consiste à mesurer de manière continue la différence d'indice de réfraction entre une phase mobile (éluant) et le soluté.
Ampérométrie et polarographie	Consistent à mesurer le changement du courant entre deux électrodes.
Conductivité	Consiste à mesurer la conductivité électrique due à la présence d'un soluté dans la phase mobile.
Spectroscopie infrarouge	Consiste à mesurer l'absorbance d'une substance dans l'infrarouge.
Spectroscopie de masse	Permet de caractériser la masse des produits à l'état de traces et permet d'obtenir des informations poussées sur la structure.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

2.4.6 Mode opératoire

Equilibrer la colonne avec la phase mobile et le débit indiqué, à température ambiante ou à la température spécifiée dans la monographie, jusqu'à obtention d'une ligne de base stable [44].

Préparer la (les) solution (s) à examiner et la (les) solution (s) témoin (s) prescrites. Les solutions doivent être exemptes de particules solides [44].

3.5 Pic chromatographique

Le résultat observable d'une analyse HPLC se présente sous la forme d'un « chromatogramme », comme illustré dans la **figure 2.14** ci-dessous.

Le chromatogramme est une représentation, graphique ou autre, de la réponse d'un détecteur, de la concentration d'un effluent ou d'une autre grandeur utilisée comme mesure de la concentration d'un effluent en fonction du temps, du volume ou de la distance. Idéalement, un chromatogramme se présente comme une séquence de pics gaussiens au-dessus d'une ligne de base [44].

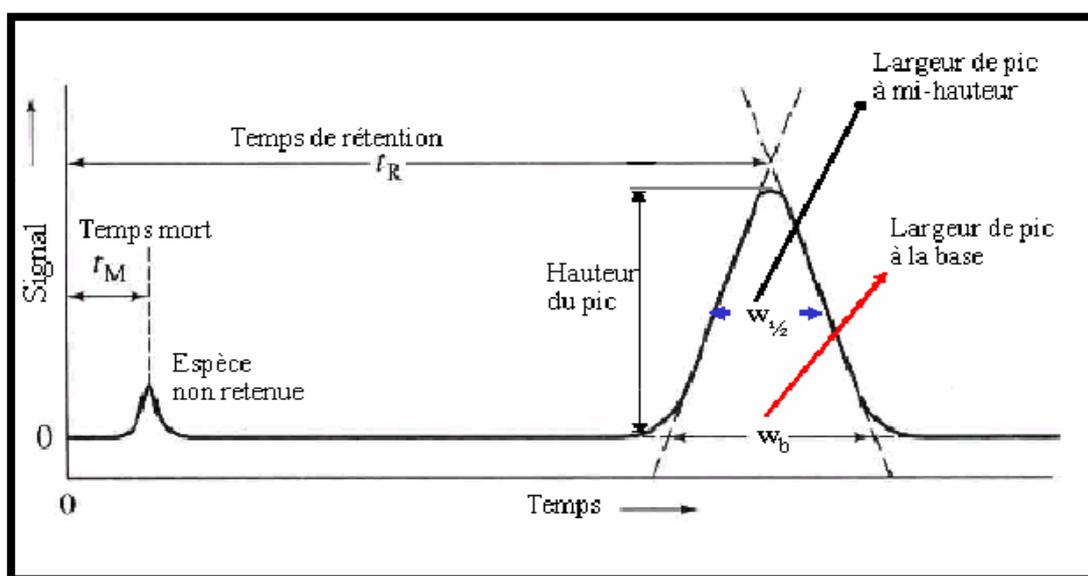


Figure 2.14: Principaux paramètres d'un chromatogramme [39]

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

2.5.1 Grandeurs de rétention

Plusieurs grandeurs nous renseignent sur la conformité du système chromatographique :

🚦 Temps de rétention t_R :

En chromatographie d'éluion, les mesures de rétention peuvent être exprimées en termes de temps de rétention t_R directement défini par la position du maximum du pic dans le chromatogramme [44]. Ce temps de rétention peut être déduit par le calcul de volume de rétention V_R :

$$V_R = v \times t_R$$

[44]

- t_R = temps de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré, comme illustré dans la figure qui suit : (Figure 2.10 .)
- v = débit de la phase mobile [44].

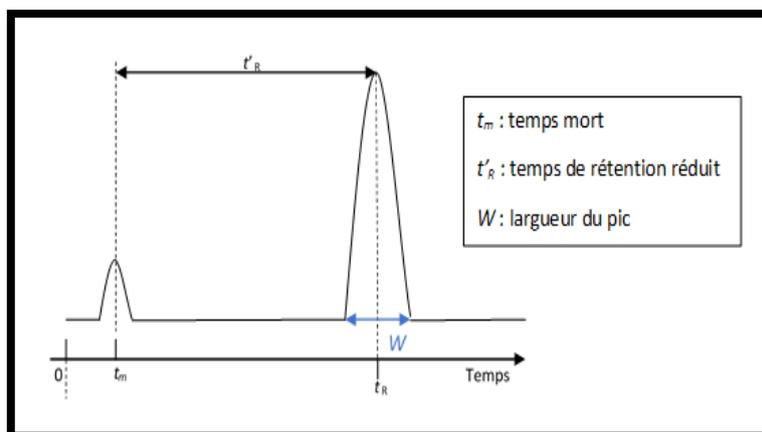


Figure 2.15 : Chromatogramme illustrant le t_R , t'_R , t_M [39]

Le temps de rétention représente le temps que met le soluté à sortir de la colonne, c'est-à-dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué, c'est la principale grandeur de rétention [44] [52]. Il varie en fonction du débit, de la température d'éluion, de la composition de la phase mobile et du vieillissement de la colonne [52].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

Le volume de rétention de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne [44].

✚ Coefficient de distribution massique D_m

Le coefficient de distribution massique ou facteur de capacité k' ou facteur de rétention k est défini comme suit :

$$D_m = \frac{\text{quantité du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{quantité du soluté dans la phase mobile}} = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

[44]

- K_C = coefficient de distribution à l'équilibre (ou constante de distribution),
- V_S = volume de la phase stationnaire,
- V_M = volume de la phase mobile [44].

Le coefficient de distribution massique d'un composant peut être déterminé à partir du chromatogramme, à l'aide de l'expression :

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

[44]

- t_R = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,
- $t_M = t_0$ = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time ») [44].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

Le temps mort représente le temps mis par la phase mobile pour aller de l'injecteur au détecteur.

Le coefficient de distribution massique D_m est un paramètre expérimental important qui traduit l'affinité d'un composé pour la phase stationnaire. Il rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir un composé. Ce paramètre ne dépend pas du débit de la phase mobile, ni des dimensions de la colonne mais affecté par toutes les autres conditions chromatographiques mais affecté par toutes les autres conditions chromatographiques [16] [30]

🚦 Coefficient de partage

En chromatographie d'exclusion, les caractéristiques d'élution d'un composant dans une colonne particulière peuvent être décrites par le coefficient de partage K_o , calculé à l'aide de l'expression :

$$K_o = \frac{t_R - t_o}{t_t - t_o} \quad [44]$$

- t_R = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,
- $t_o = t_M$ = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time »)[44],
- t_t = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant ayant accès à tous les pores de la phase stationnaire[44].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

2.5.2 Données chromatographiques

🚩 Largeur d'un pic chromatographique

Les pics chromatographiques ont une allure gaussienne. Un pic peut être défini par sa surface A (calculée en assimilant le pic à un triangle), par sa hauteur h ainsi que sa largeur, comme illustré par la figure ci-dessous [44] [53].

La largeur d'une courbe de Gauss est définie par :

- $w = \omega$ = largeur à la base du pic
- $wh = \delta$ = largeur à mi-hauteur
- σ = écart type = $\frac{1}{2}$ largeur du pic à la hauteur des points d'inflexion, à 60,6% de la hauteur [53].

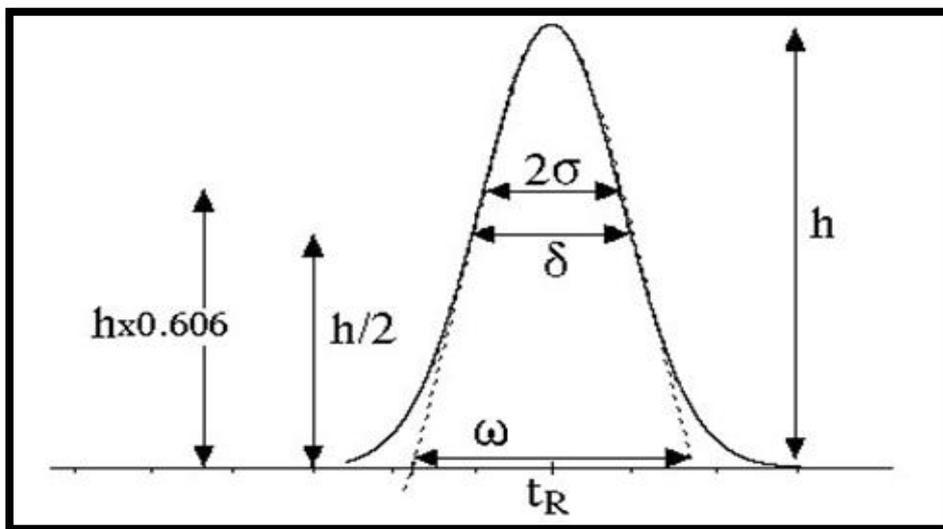


Figure 2.16 : Chromatogramme et largeurs du pic chromatographique [53].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

✚ Performance d'une colonne et nombre apparent de plateaux théoriques:

La performance d'une colonne (efficacité apparente) peut être calculée, à partir de données obtenues dans des conditions isothermes, isocratique ou isodenses, selon la technique utilisée, en termes de nombre apparent de plateaux théoriques N , à l'aide de l'expression suivante, où les valeurs de t_R et w_h doivent être exprimées dans la même unité (de temps, volume ou distance) [44]:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

[44]

- t_R = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,
- w_h = largeur du pic à mi-hauteur [44].

Le nombre apparent de plateaux théoriques dépend du composant considéré, ainsi que de la colonne et du temps de rétention [31] [44].

L'efficacité d'une colonne chromatographique est mesurée pour chaque composé, par le nombre apparent de plateaux théoriques N de la colonne [32].

Cette théorie est née à la recherche d'un modèle permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme celui d'une colonne à distiller [32] [44][17][49].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

Au lieu de considérer le déplacement réel, continu de la phase mobile, on admet que celle-ci progresse par sauts successifs et donc que chaque soluté se déplace progressivement dans la colonne en une suite d'étapes distinctes. A chacune de ces étapes, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration du soluté dans la phase stationnaire. On peut alors imaginer la colonne de chromatographie comme une série de compartiments distincts dans lesquels s'établit l'équilibre de répartition du soluté. Ces compartiments imaginaires sont ce qu'on appelle les « plateaux théoriques ». A chaque nouvel équilibre, le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne. (Figure 2.19)[39].

La chromatographie est décrite comme une suite de temps d'équilibration suivis de glissements de la phase mobile d'un plateau par rapport à la phase stationnaire [39].

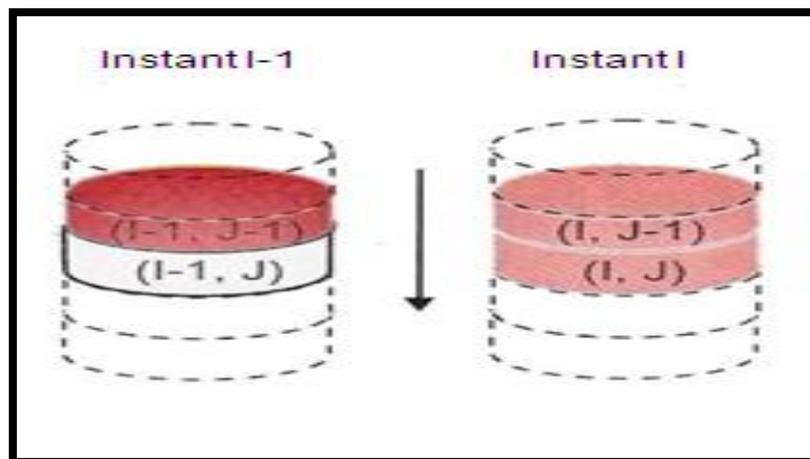


Figure 2.17 : Illustration du modèle de plateaux théoriques [39].

La colonne de longueur L est donc découpée en N petits disques fictifs ou « plateaux théoriques » de même hauteur, dans chacun d'eux s'établit l'équilibre de répartition du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile, d'où l'expression :

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

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

- N = Nombre apparent de plateaux théoriques.
- L = Longueur de la colonne (cm).
- HEPT = Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (cm)[52].

2.5.3 Paramètres de séparation

🚦 Résolution R_s

La résolution correspond à une grandeur numérique caractérisant l'aptitude du système chromatographique (colonne, solutés, solvants) à séparer deux composés d'un mélange. Ce paramètre nous renseigne sur la qualité de la séparation [7] [49].

La résolution R_s entre deux pics peut être calculée à l'aide de l'expression suivante:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$
$$t_{R2} > t_{R1}$$

[44]

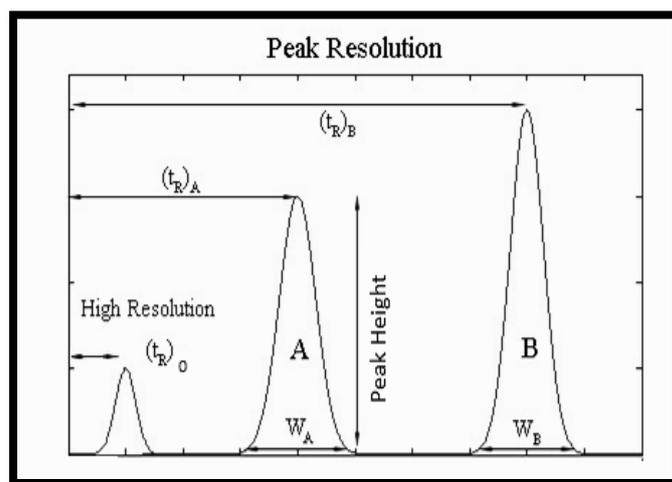


Figure 2.18 : Chromatogramme et résolution [26].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

- T_{R1} et t_{R2} = temps de rétention ou distances sur la ligne de base entre le point d'injection et les perpendiculaires abaissées des maximums de deux pics adjacents,
- W_{h1} et w_{h2} = largeur des pics à mi-hauteur [44].

Une résolution supérieure à 1,5 correspond à une séparation jusqu'à la ligne de base.

Les trois chromatogrammes ci-dessous illustrent des exemples de séparation chromatographique de deux composés:

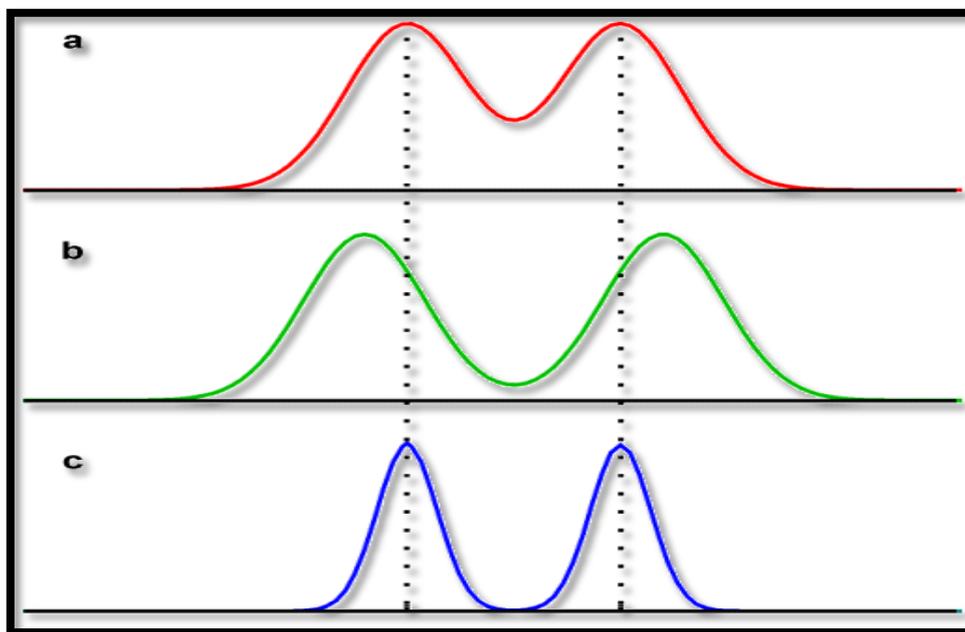


Figure 2.19 : Exemples de séparation chromatographique de deux composés [44][20].

- (a) Les pics se recouvrent.
- (b) La distance séparant les sommets des pics est plus grande mais les largeurs à la base sont les mêmes qu'en (a).
- (c) La distance séparant les sommets des pics est égale à celle trouvée en (a) mais les largeurs à la base sont plus petites qu'en (b).

Comme la montre la figure ci-dessus, la séparation idéale est réalisée en (c).

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

✚ Rétenion relative

La rétenion relative « r »est une estimation calculée à l'aide de l'expression :

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad [44]$$

- t_{R2} = temps de rétenion du pic considéré,
- t_{R1} = temps de rétenion du pic de référence (généralement celui de la substance à examiner),
- t_M = temps de rétenion ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time »)[44].

La rétenion relative non ajustée r_G est calculée à l'aide de l'expression :

$$r_G = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad [44]$$

Sauf indication contraire, les valeurs de rétenion relative indiquées dans les monographies correspondent à la rétenion relative non ajustée [44].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

✚ Sélectivité α

Le facteur de sélectivité α est défini par le rapport de coefficient de distribution de l'espèce la plus retenue, au coefficient de distribution de l'espèce la plus rapidement élué, il est calculé à partir de l'équation suivante:

$$\alpha = K_2 / K_1$$

On a:

$$K_2 = t_{R'2} / t_M$$

$$K_1 = t_{R'1} / t_M$$

Donc:

$$\alpha = t_{R'2} / t_{R'1}$$

Donc, elle représente le rapport entre deux temps de rétention réduit [45]:

$$\alpha = t_{R'2} / t_{R'1}$$

La sélectivité α permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme [16] [49].

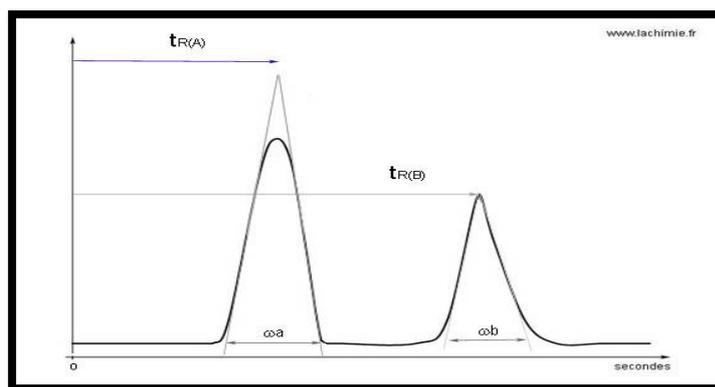


Figure 2.20: Paramètres pour calculer la sélectivité [69][74].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

2.6 La perte de charge dans une colonne

La perte de charge est une caractéristique de la colonne. Elle exprime sa résistance à l'écoulement de la phase mobile. Elle est appelé aussi pression de la colonne [16].

La perte de charge Δp dans une colonne est donnée par la loi de DARCY:

$$\Delta p = \eta L u / B_0 \quad [16]$$

- Δp : Perte de charge en pascalle (Pa). 1 Pa = $1 \cdot 10^{-5}$ bar.
- η : Viscosité de la phase mobile en Pa.s.
- L : Longueur de la colonne (m).
- U : Vitesse linéaire de la phase mobile ($m \cdot s^{-1}$).
- B_0 : Perméabilité spécifique (m^2). [16]

La perméabilité spécifique d'une colonne remplie est:

$$B_0 = d_p^2 / \Phi \quad [16]$$

- d_p : Diamètre des particules de remplissage [16].
- Φ : Facteur de résistance à l'écoulement

2.7 Le comportement d'un pic chromatographique

Dans les conditions idéales, un pic chromatographique doit avoir une forme gaussienne et présente une symétrie parfaite, mais en pratique plusieurs pics n'ont pas une meilleure symétrie, en plus un pic chromatographique peut présenter soit une trainée ou un fronting [17].

Le phénomène d'adsorption et les bandes élargies de pré-colonne, provoquent une trainée de pic, tandis que la surcharge de la colonne ou une réaction chimique de l'analyte pendant l'élution entraînent un fronting du pic [17].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

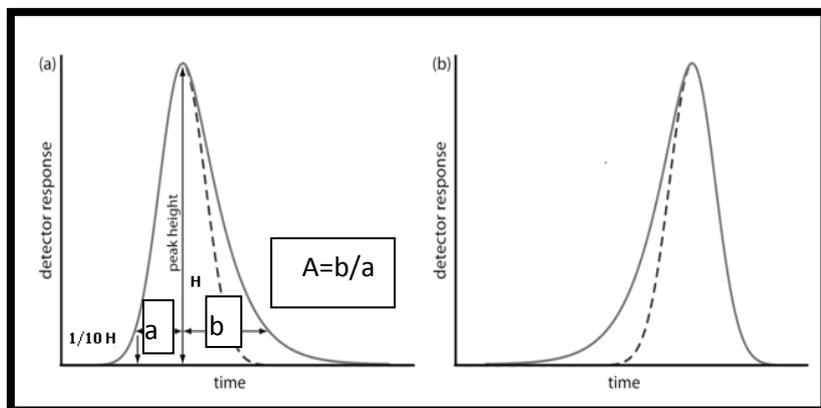


Figure 2.21: Exemple d'une asymétrie de pic chromatographique.

Avec : (a) représente une trainé de pic, (b) représente un fronting [62]

2.7.1 Facteur de symétrie A_s

Le facteur de symétrie A_s d'un pic est calculé à l'aide de l'équation suivante:

$$A_s = W_{0.05}/2d$$

[44]

- $W_{0.05}$: Largeur du pic au vingtième de sa hauteur.
- d : Distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur [44].

2.7.2 Facteur d'asymétrie (ou facteur de trainé T_f)

Selon l'United States Pharmacopeia (USP), le facteur de trainé est calculé à l'aide de l'équation suivante:

$$T_f = a + b/2a$$

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

- **a** : Distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic (mesurée à 5% de la hauteur du pic).
- **b** : distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord de sortie du pic (mesurée à 5%de la hauteur du pic) [17].

2.8 Test de conformité du système (TCS) (système suitability test SST)

Le test de conformité du système constitue l'une des parties les plus importantes dans l'analyse chromatographique dont l'objet de ce test est de s'assurer de la performance du système utilisé pour l'analyse et de montrer que le système de mesure est satisfaisant au moment de l'analyse [44].

2.8.1 Définition du test de conformité du système

Conformément à l'USP, les tests de conformité du système (en anglais, Système Suitability tests) font partie intégrante des méthodes chromatographiques gazeux et liquides. Ils visent à vérifier la performance du système chromatographique, par la vérification de quelques paramètres tels que la résolution et la reproductibilité de ce système [4] [17] [44].

2.8.2 Période d'application du test

Le système doit satisfaire aux critères de conformité pendant toute la procédure chromatographique. Il revient à l'analyste de définir, en fonction de facteurs tels que la fréquence d'utilisation de la procédure et son expérience du système chromatographique, un programme de contrôle approprié pour assurer le suivi de la conformité.

Selon les derniers directives de l'USP et L' ICH, le TCS doit être effectué avant et pendant tous les essais réglementés [17] [44].

Cependant le plus souvent, le test de conformité du système (TCS) est fait au moment de lancement de l'analyse.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

2.8.3 Paramètres à vérifier pour l'évaluation d'un système chromatographique:

Le test de conformité du système (TCS) est effectué en injectant jusqu'à six injections de la même vial du standard. il permet d'évaluer la performance et de juger sur la capacité d'un système chromatographique à séparer les constituants d'un composé par l'utilisation des paramètres regroupés dans le tableau ci-dessous, dont les normes soit fixées dans la procédure interne du laboratoire ou dans les référentiels tels que United States Pharmacopiea (USP) et la Pharmacopée européenne (Ph.Eur)[17] [44].

Tableau 2.11: Les paramètres du test de conformité du système.

Paramètres	Description
Résolution Rs	Mesure du degré de séparation des pics au niveau du chromatogramme.
Répétabilité Sr (ou RSD)	Mesure de la reproductibilité du système durant l'analyse chromatographique.
Facteur de capacité K'	Mesure du degré de rétention de l'analyte.
Nombre de plateaux théoriques N	Mesure l'efficacité de la séparation.
Facteur de symétrie As(ou Tf)	Mesure de la symétrie d'un pic.

Les limites de ces paramètres sont mentionnées sur le tableau suivant :

Tableau 2.12: Limites de paramètres de TCS selon les renseignements de l'USP et FDA
[10] [17] [57]

Paramètres	Résolution% (Rs)	Répétabilité (Sr ou RSD)	Facteur de capacité	Nombre de plateaux théoriques	Facteur de symétrie As (ou t_f facteur de trainé)
Limites	> 2,0	≤ 1,0 pour 5 injections répétées	> 2,0	> 2000	≤ 2,0 selon USP 0,8 ≤ As ≤ 1,5 Selon l'EP

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

La répétabilité est exprimée en pourcentage par l'écart type relatif S_r (selon l'USP il est désigné par RSD, relative standard déviation), estimé à partir des résultats d'une série d'au moins 3 mesures consécutives réalisées par injection d'une solution témoin, il est calculé à l'aide de l'équation suivante: [44]

$$S_r(\%) = 100/\bar{y} [\sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2} / n - 1] \quad [44]$$

- y_i : Valeurs individuelles (surfaces ou hauteurs de pic ou rapport de surface pour méthode d'étalon).
- \bar{y} : Moyenne des valeurs individuelles.
- n : Nombre des valeurs individuelles [44].

Si au moins l'un des paramètres du système est non conforme à la norme fixée dans la procédure analytique, il convient de prendre les mesures suivantes:

- 1) Arrêter immédiatement de la séquence à réaliser.
- 2) Procéder à un diagnostic convenable pour résoudre le problème.
- 3) Faire les ajustements requis.
- 4) Réaliser un autre test de la conformité du système (TCS) [17].

2.9 Domaines d'application de la Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les domaines d'application de l'HPLC sont extrêmement nombreux et vastes. Elle est utilisée comme méthode d'analyse qualitative et quantitative aussi bien dans les services de recherche et développement que dans le domaine du contrôle [51]. Son champ d'activité couvre les organismes d'État et les industries de la chimie, biochimie, pharmacie et parachimie (agrochimie, cosmétiques, parfums, caoutchoucs, polymères, matériaux composites, fermentations) et même la médecine (humaine et vétérinaire), la génétique, la toxicologie, la pharmacognosie, l'environnement, le droit et la justice (police scientifique, douanes, répression des fraudes) [7] [11] [51].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

Citons plus particulièrement trois domaines dans lesquels l'utilisation de l'HPLC reste incontestable :

- Contrôle de la pureté optique des molécules thérapeutiques.
- Analyse des résidus et des traces dans le domaine environnemental.
- Suivi des concentrations des composés cytotoxiques (chimiothérapie anticancéreuse) [11].

L'HPLC permet l'analyse, le dosage et l'étude de la stabilité soit de substances thermiquement instables, puisque l'opération s'effectue à température ambiante, soit de substances peu volatiles de masse moléculaire pouvant atteindre 2 000 000, soit encore de substances ionisées [51]. C'est donc, une méthode « douce » avec les molécules. La grande importance de l'HPLC provient de sa vitesse d'exécution, de son grand pouvoir de résolution et de son aptitude à analyser de manière qualitative et quantitative de faibles quantités d'échantillon [36] :

L'analyse qualitative consiste à identifier les substances à analyser par leur temps de rétention, lequel pour des conditions données (solvant, débit, colonne, etc...) est caractéristique du composé [11].

L'analyse quantitative consiste à déterminer la quantité de chaque composé du mélange qui pour des conditions données est proportionnelle à la surface du pic correspondant [11].

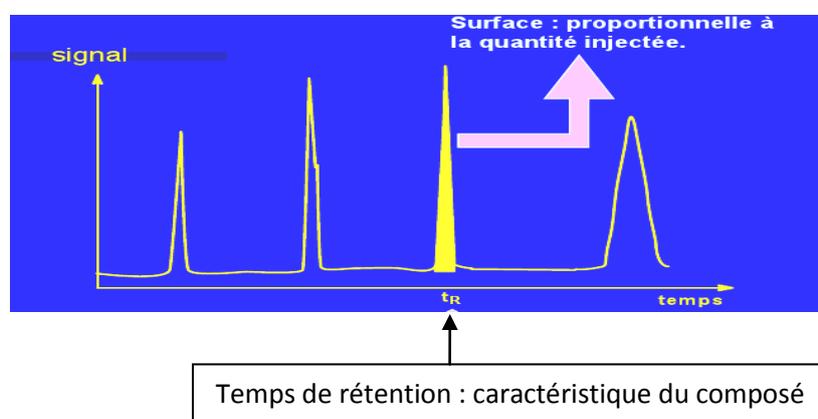


Figure 2.22 : Illustration de l'aspect qualitatif et quantitatif de l'HPLC [11].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre II: Chromatographie/chromatographie liquide haute performance(HPLC)

De ce qui précède, il ressort que L'HPLC est une méthode d'analyse qualitative et quantitative qui repose sur différents mécanismes séparatifs.

Les résultats obtenus ne sont significatifs que s'ils répondent aux critères de conformité du système, à défaut de cela il serait utile et inéluctable de recourir à une optimisation de ces paramètres nécessitant systématiquement une validation.

Chapitre III:

*Optimisation des conditions
opératoires d'une méthode
analytique chromatographique*

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique chromatographique

La séparation obtenue après des essais préliminaires n'est pas toujours satisfaisante. Lorsque la résolution est insuffisante, le temps d'analyse trop long, ou l'efficacité de la colonne n'est pas satisfaisante, les conditions expérimentales doivent être modifiées.

Tout changement majeur effectué doit impérativement être suivi d'une validation analytique, dans le but de démontrer que la méthode est valide et le restera dans le temps.

1. Optimisation des conditions opératoires d'une méthode chromatographiques

1.1 Paramètres liés à l'optimisation

Une amélioration peut être envisagée si la séparation obtenue n'est pas convenable. L'optimisation consiste à agir sur différents paramètres liés soit à la colonne, soit à la phase stationnaire, soit à la phase mobile.

Lors de chaque changement effectué, il est impératif de s'assurer que tous les paramètres de suitability restent toujours conformes.

1.1.1 Augmentation de l'efficacité d'une colonne

La largeur d'un pic et son asymétrie est caractéristique de l'efficacité de la séparation : Plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace, étant donné que l'efficacité est mesurée par la relation :

$$N = L/H \quad [49]$$

Donc l'efficacité d'une colonne augmente lorsque le N augmente ou si H diminue à longueur L constante [49].

N= nombre des plateaux théoriques

L= longueur de la colonne.

H= hauteur de plateau théorique

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique chromatographique

Augmentation de nombre de plateau théorique

selon l'équation :

$$N = 16 (t_R / \omega t)^2$$

L'augmentation de N revient à rétrécir le pic à la base (diminuer ωt) et donc diminuer le facteur d'asymétrie [7].

Diminution de la hauteur équivalente à un plateau théorique dans ce cas on s'efforcera sur la :

- Diminution du diamètre « d p » des particules de la phase stationnaire

Au voisinage de la vitesse réduite optimale v_{opt} , « h » est minimale, on peut écrire :

$$H = h_{min} \cdot dp$$

Cette expression montre que la diminution de la taille des particules est accompagnée par une diminution de H, donc une augmentation de l'efficacité de la colonne et une diminution du facteur d'asymétrie A_s et la largeur du pic chromatographique. (ΔP inversement proportionnelle à dp^2) [2] [3] [50].

Comme l'illustre le schéma ci-dessous, plus la taille des particules remplissant la phase stationnaire augmente plus l'efficacité de la colonne réduit.

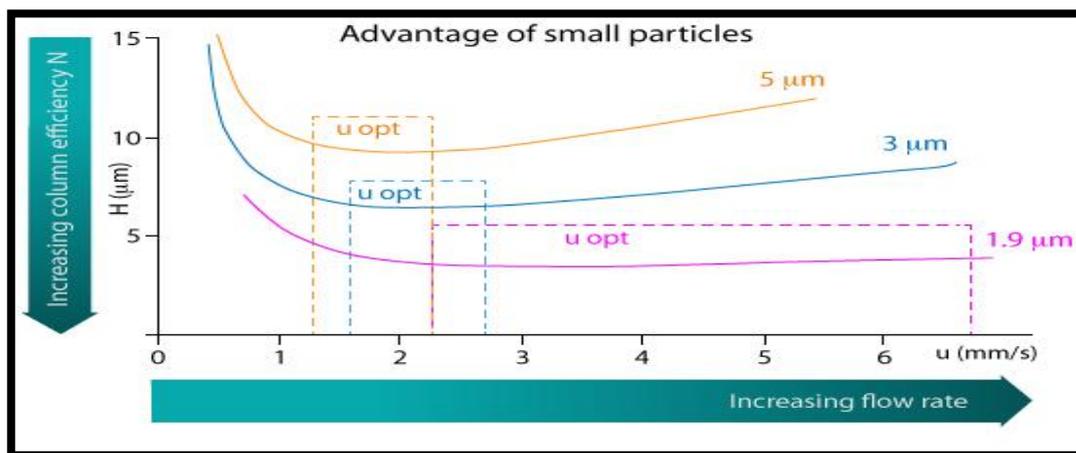


Figure 1.23 : Effet du diamètre des particules remplissant la phase stationnaire sur N [64].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique chromatographique

- Diminution du diamètre de la colonne
- Minimisation de l'épaisseur du film liquide [7] [49] [50].

L'augmentation de l'efficacité de la colonne, peut présenter les inconvénients suivants:

- Augmentation du temps d'analyse :

$$t_R = \omega l / 4\sqrt{N}$$

- Augmentation de la perte de charge [50]:

$$\Delta P = \Phi L \cdot V / d$$

1.1.2 Augmentation de la vitesse «v» de la phase mobile

On peut également augmenter la vitesse d'écoulement de la phase mobile et donc la modification de débit. Cette modification se traduit par la diminution du temps d'analyse mais présente deux inconvénients :

- Une augmentation de la perte de charge.
- Une perte de l'efficacité de la colonne.

($v > v_{opt}$ branches ascendantes des courbes de Van Deemter et de celle de KNOX)[50].

La figure suivante représente la courbe de Van Deemter qui montre que l'efficacité d'une colonne est directement liée au débit de la phase mobile.

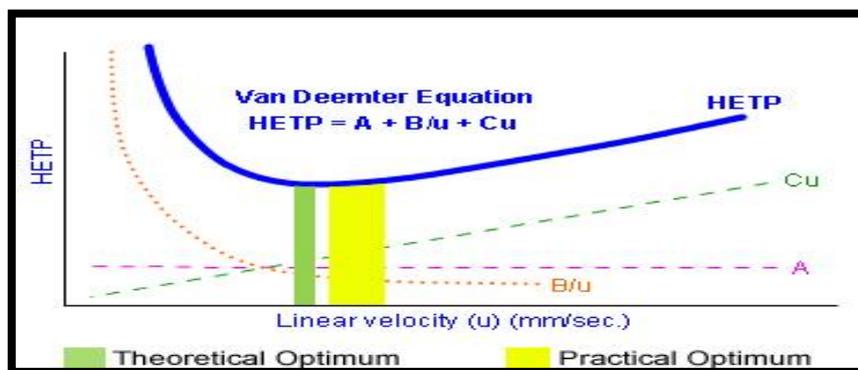


Figure 1.24 : Courbe de Van Deemter [64].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique chromatographique

Il faut travailler à un débit égal ou supérieur au débit optimal de manière à garder la hauteur le plus petit possible et donc garantir un maximum d'efficacité, il est préférable donc de manipuler avec un débit correspondant au minimum de la courbe [50] [12] [70].

Voici ci-dessous un tableau récapitulatif des avantages et des inconvénients de chacun de ces trois changements cités :

Tableau 1.13: Avantages et inconvénients de modification de L, v et dp.

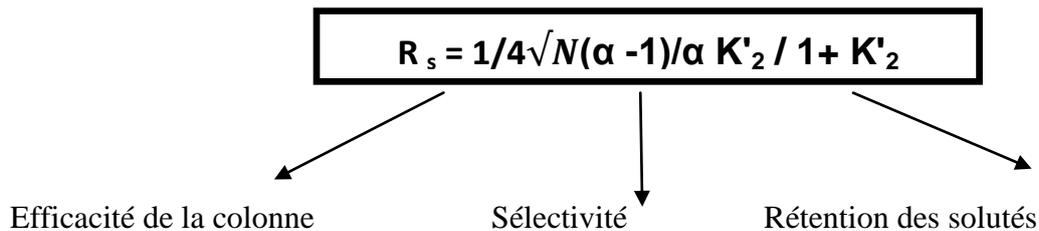
Parametres chromatographiques	Modification	Consequences
L : longueur de la colonne d p : diamètre des particules de la phase stationnaire v : vitesse de la phase mobile	-Augmentation -Constant -Constante	-Efficacité élevée Inconvénients : - Temps d'analyse: t_R augmente - Perte de charge ΔP augmente
L : longueur de la colonne dp : diamètre des particules de la phase stationnaire v : vitesse de la phase mobile	-Constant -Diminution -Constante	HEPT diminuée => Efficacité augmentée Inconvénient : Augmentation rapide de ΔP
L : longueur de la colonne dp : diamètre des particules de la phase stationnaire v : vitesse de la phase mobile	-Constante -Constant -Augmentation	-v $> v_{opt}$ -Temps d'analyse: diminue -Inconvénients : - ΔP élevée et Efficacité réduit

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique chromatographique

1.13 Optimisation de la résolution

L'équation de PURNEL montre que pour accroître R_s on peut augmenter l'un des trois facteurs: sélectivité, rétention des solutés ou efficacité de la colonne [7] [50].



✚ La sélectivité α :

- C'est le terme $\alpha - 1/\alpha$ qui représente l'intervention de la sélectivité.
- α Doit être > 1 pour qu'une séparation entre deux solutés soit possible.
- Une faible variation de α est responsable de grande modification de la valeur du rapport $\alpha - 1/\alpha$ [50] [32].

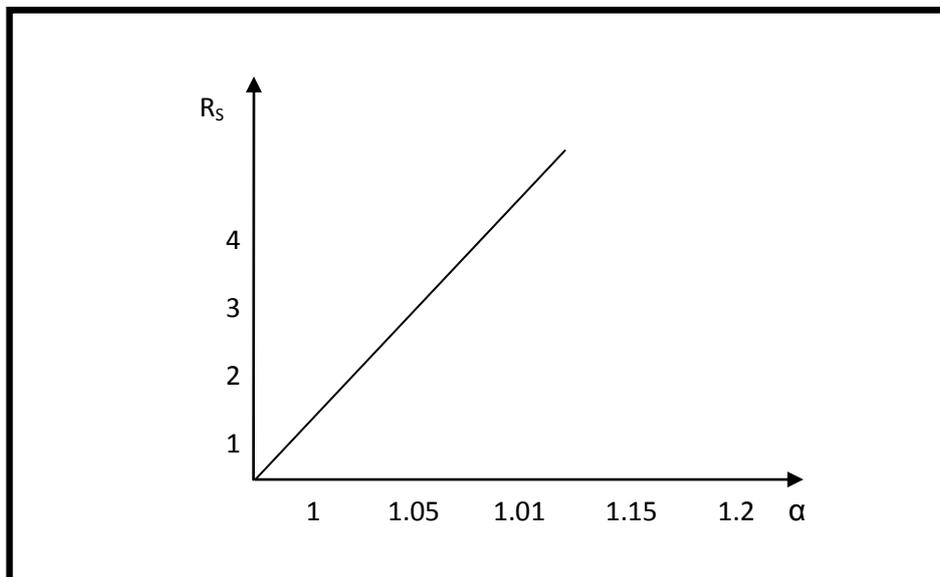


Figure 1.25: Variation de R_s en fonction de α pour $K_2 = 5$ et $N = 10000$ [50] [32].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique chromatographique

La sélectivité est fonction de coefficients de dissociation des constituants du mélange à analyser:

$$\alpha = K_{D2} / K_{D1}$$

La sélectivité peut donc être changée:

- ✓ En modifiant la nature et la composition de la phase mobile.
- ✓ En changeant la phase stationnaire.
- ✓ En modifiant la température [49] [50].

✚ Le facteur de rétention K'

Le facteur K' de la substance la plus retenue intervient dans l'expression de la résolution par l'intermédiaire de rapport $K' / 1+K'$

- Si $k' = 0 \rightarrow R_s = 0$ les deux solutés sortent en même temps de la colonne, la résolution est nulle.
- Si K' augmente R_s augmente mais la valeur du rapport $K' / 1+K'$ tend vers 1 [50]. et le gain en résolution devient négligeable lorsque $K'=10$.

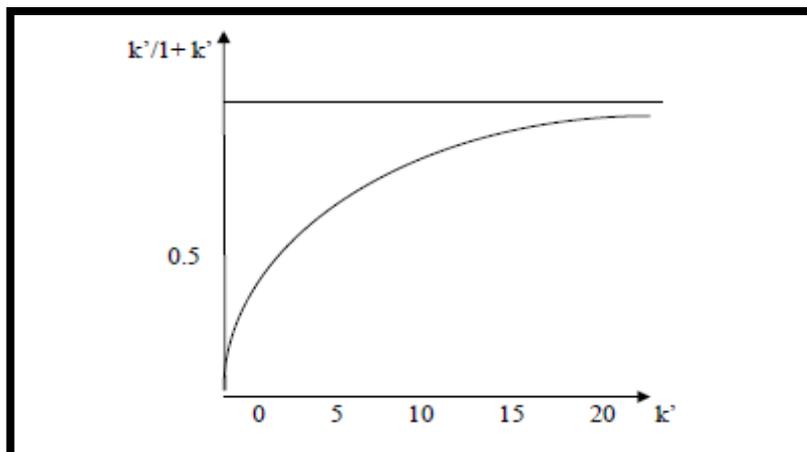


Figure 1.26: Variation du rapport $K' / 1+K'$ en fonction de K' .

Inconvénient : Lorsque $k' = 10$ le temps d'analyse augmente $t_R = L / v (1+ k')$.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique chromatographique

En général les valeurs de K' doivent être comprises entre 2 et 5.

✚ Efficacité N

-L'efficacité intervient par \sqrt{N} dans l'expression de la résolution.

-L'augmentation de N par le biais d'un allongement de la longueur de la colonne présente des inconvénients. On a recours à la diminution de H en agissant sur le diamètre des particules de la colonne, le débit de la phase mobile, le pH de la phase mobile et les proportions de la phase mobile [50].

1.1.4 Optimisation de la durée d'analyse

Lorsque la résolution est fixée, il faut déterminer les conditions conduisant à un temps d'analyse réduit et à une pression minimale.

$t_R = L / v (1 + K_2')$	➔	$t_R = l dp^2 / v D_m (1 + K_2')$
$\Delta p = \Phi \eta L u / d p$	➔	$\Delta p = \Phi \eta L D_m / dp^2$

On constate que:

- La perte de la charge est inversement proportionnelle à dp^2

- Le temps d'analyse est proportionnel à dp^2

Les valeurs optimales de ces deux paramètres sont obtenues :

-Soit par des mises au point.

-Soit en utilisant des abaques [50].

Il existe des abaques qui peuvent donner, pour différentes granulométries de la phase stationnaire:

-Soit la perte de charge, la durée d'analyse et le nombre de plateaux théorique pour une colonne de longueur connue L.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique chromatographique

-Soit la perte de charge, la durée d'analyse et la longueur de la colonne pour un nombre de plateaux théorique N.

-Soit la longueur de la colonne, la durée du temps d'analyse et le nombre de plateaux théoriques pour une perte de charge donnée [50].

1.2 Paramètres les plus sensibles permettant une meilleure optimisation de la méthode d'analyse

1.2.1 Modification du pH de la phase mobile

Il est aussi important de contrôler le pH de la phase mobile car celui-ci a une forte influence sur la balance hydrophile/hydrophobe, il influe notamment la forme prédominante de la molécule à analyser ayant un caractère acido-basique [2].

Lorsque le composé est ionisable, il est nécessaire de tamponner les solutions afin de fixer les proportions de chacune de formes en équilibre (forme libre/forme ionisée) d'où l'intérêt du tampon. Dans un milieu exempt du tampon, une petite variation de pH peut être à l'origine d'une énorme variation dans la rétention et dans la séparation chromatographique du composé [2] [49].

1.2.2 Modification de la polarité de la phase mobile

Dans le cas d'une chromatographie de partage en phase inversée ; la polarité de phase mobile a une importance capitale. Les solutés polaires ont tendance à être attirés par la phase mobile polaire et les solutés apolaires ont tendance à être plus retenus par la phase stationnaire apolaire.

On pourra donc jouer sur la polarité de la phase mobile tout en faisant varier la teneur en eau et en solvant organique suivant leur polarité et leur pouvoir éluant qui influe à la fois sur le temps d'analyse et le facteur de rétention K et par conséquence l'amélioration de pouvoir séparateur et donc d'optimiser la séparation[48] [63].

Afin d'ajuster la force éluante de la phase mobile, on pourra utiliser un solvant pur ou mélanger plusieurs solvant miscibles en fonction des solutés à séparer. La figure ci-

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre III: Optimisation des conditions opératoires d'une méthode analytique chromatographique

A l'issue de cette étude, on pourra constater que l'optimisation des conditions de séparation par la méthode HPLC améliore grandement ses performances.

Cependant toute modification faite doit s'inscrire dans les normes fixées dans l'ajustement des conditions chromatographiques selon l'United States Pharmacopoeia (USP) et la Pharmacopée Européenne (Ph.Eur), dans le cas contraire une revalidation s'impose.

Chapitre IV:

Validation et Revalidation analytique

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre IV: Validation et Revalidation analytique

Le cycle de vie d'une méthode analytique passe par plusieurs étapes caractérisant son évolution au sein des laboratoires. En pratique courante, après la mise au point complète de la méthode, il vient l'étape de validation pour qu'elle soit utilisée en routine avec une revue périodique pouvant aboutir à une revalidation ou un ajustement de(s) paramètre(s) afin d'élaborer un nouveau cycle de vie.

1. Validation

1.1 Définition

La validation est un protocole important qui permet de démontrer qu'une méthode analytique, un élément de matériel ou un système convient à l'usage pour lequel il est destiné tout en procurant des résultats exactes et fiables de façon uniforme et continue [29][46]. Elle représente une procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances des méthodes permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée [60]. Elle est ainsi définie par la norme ISO 17025 :2005 comme : « La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [23].

1.2 Critères de validation

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. Donc elle a pour but de démontrer qu'elles correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées. [6] [17] [24] [68]

En général, elle porte sur les critères de performances suivants :

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre IV: Validation et Revalidation analytique

1.2.1 Spécificité

Capacité d'une procédure de permettre une évaluation univoque de l'analyte en présence de composés susceptibles d'être présents (impuretés, produits de dégradation, résidus de synthèse, matrice...) [4] [28].

1.2.2 Fidélité

Étroitesse de l'accord entre une série de mesures obtenues dans des conditions prescrites à partir de prises d'essais multiples provenant d'un même échantillon homogène. Elle peut être évaluée à trois niveaux : [28] [24] [8].

Répétabilité

Selon la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (**SFSTP**) la répétabilité se définit comme des conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur les individus d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps [4][9].

Fidélité intermédiaire

Selon **SFSTP**, la fidélité intermédiaire sont des conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur les individus d'essais identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents pendant un intervalle de temps donné [4] [9].

Reproductibilité

Selon **SFSTP**, la reproductibilité se définit comme des conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur les individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents) [4] [9].

1.2.3 Fonction de réponse

Relation existant entre la réponse et la concentration en substance à examiner dans l'échantillon [28].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre IV: Validation et Revalidation analytique

1.2.4 Exactitude

L'exactitude est l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir de larges séries d'essais et une valeur de référence acceptée [28].

1.2.5 Seuil de détection

Le seuil de détection est la plus petite quantité ou concentration d'une substance à analyser qui puisse être détectée avec une certitude suffisante [28].

1.2.6 Seuil de quantification

Le seuil de quantification est la plus petite quantité ou concentration d'une substance à analyser qui puisse être dosée avec une certitude suffisante [28]

1.2.7 Intervalle d'application :

L'intervalle d'application est l'intervalle compris entre la concentration (quantité) la plus élevée et la plus faible de l'échantillon dans lequel il a été démontré que la méthode d'analyse présente une fidélité, une exactitude et une linéarité satisfaisante [4][8].

1.2.8 Robustesse

La robustesse est la capacité du protocole de rester non affectée par des variations faibles mais délibérément introduites dans les paramètres de la méthode; fournit une indication sur sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation [4] [25] [60].

Une fois la validation d'un procédé ou d'un système à lieu et en l'absence de tout changement, sa maîtrise doit être définitivement acquise [41] [46] [61].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre IV: Validation et Revalidation analytique

La validation a pour objectif d'assurer que l'usage ultérieur en routine de la procédure ainsi validée fournit des résultats proches de la valeur vraie ou inclus dans les limites acceptables selon le besoin de l'analyse [21].

2. Revalidation analytique

Suite à une modification dite majeur (modifier la voie de synthèse de la substance pharmaceutique, de la composition du produit fini, de la procédure analytique, etc), un problème, un changement d'une pièce d'un équipement, un remplacement du matériel ou déplacement de celui-ci, une revalidation doit être entrepris. Elle explore la performance de la validation en vue de vérifier que les changements introduits volontairement ou non dans le procédé et/ou dans son environnement ne comporte aucun risque pour les caractéristiques du procédé et la qualité du produit [4][41] [60][61] [71].

Selon les recommandations ICH 2005, une revalidation d'une procédure analytique quantitative requière la détermination des paramètres de validation suivants uniquement :

1. Linéarité
2. Fidélité
3. Spécificité
4. Exactitude [4] [9].

3. Ajustement des conditions opératoires en chromatographie

Un simple ajustement des conditions chromatographiques peut être effectué comme il est défini dans la pharmacopée européenne par la possibilité de faire varier les divers paramètres d'une chromatographie tout en respectant l'intervalle préconisé sans passer par une revalidation de la méthode. Cet acte réglementaire est exigé pour que le critère de conformité soient remplis à condition de ne pas changer les fondamentaux de la procédure. Le tableau suivant (**Tableau 3.14**) envisage la plage d'ajustement [44] [57].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre IV: Validation et Revalidation analytique

Tableau 3.14: Variations admises des paramètres selon United States Pharmacopia [57] [67].

Paramètres à varier	Variations admises selon United states pharma-copia	
	Mode isocratique	Mode de gradient
Taille des particules de la phase stationnaire (granulométrie)	-Ratio L/dp constant avec N : -25% à +50%	Aucun changement admis
Diamètre interne de la colonne	Flexible	Aucun changement admis
Débit	Repose sur la taille des particules avec +/- 50%	Aucun changement admis
Volume d'injection	Flexible	Flexible
Température	+/- 10% de la température prescrite	+/- 10% de la valeur initiale
pH du composant aqueux de la PM	+/- 0.2% de la valeur décrite	+/- 0.2% de la valeur prescrite

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre IV: Validation et Revalidation analytique

Tableau 3.15: Variation des paramètres de la PM admise selon la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur) [44].

Paramètres de la phase mobile à varier	Variations admises selon la pharmacopée européenne	
	Mode isocratique	Mode gradient
Composition de la phase mobile -Pour la portion du solvant minoritaire: -Le reste de composants	+/- 30% de sa première portion en termes relatifs ou +/- 2% en termes absolus (choisir la plus grande valeur des deux) ≤ à 10% de la teneur prescrite en termes absolus	Des ajustements mineurs de la composition de la phase mobile et du gradient sont possibles à condition que: Le test de conformité du système est satisfaisant, le (s) pic (s) principaux élués aux t_R indiqués à +/- 15% après. PM exempte dans sa composition finale de pouvoir d'éluion plus faible que dans la composition prescrite
Concentration de sels du tampon (entrant dans la composition de la PM)	+/- 10% de la concentration initialement prescrite	Aucun ajustement admis
Le débit	+/- 50% de la valeur initiale (la gamme d'ajustement peut élargie si les dimensions de la colonne sont variées)	Ajustement acceptable lorsque l'on modifier les dimensions de la colonne
Le volume d'injection	Une diminution recommandée de telle sorte à obtenir une détection et une répétabilité satisfaisante du (des) pic (s) à déterminer Aucune augmentation admise	Une diminution recommandée de telle sorte à obtenir une détection et une répétabilité satisfaisante du (des) pic (s) à déterminer Aucune augmentation admise
pH du composant aqueux de la phase mobile	+/- 0.2% du pH initialement décrit sauf indication	Aucun ajustement admis

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre IV: Validation et Revalidation analytique

Tableau 3.16: Variations des paramètres de la phase stationnaire et de la colonne admises selon la Pharmacopée Européenne [44].

Paramètres de la phase stationnaire et de la colonne à varier	Variations admises selon la pharmacopée européenne	
	Mode isocratique	Mode gradient
La taille des particules de la phase stationnaire	Réduction maximale de 50% de la taille initiale Ne faire jamais augmenter	Aucun ajustement admis
La nature de la phase stationnaire	Aucun changement accepté concernant l'identité de la phase stationnaire (ne jamais remplacer une colonne de C ₁₈ par une colonne de C ₈)	Aucun changement accepté concernant l'identité de la phase stationnaire (ne jamais remplacer une colonne de C ₁₈ par une colonne de C ₈)
La longueur de la colonne	+/- 70% de la longueur initiale	+/- 70% de la longueur initiale
Le diamètre interne de la colonne	+/- 25% de la valeur initiale	+/- 25% de la valeur initiale
La température	+/- 10% de la valeur prescrite si la température est spécifiée, sauf indication contraire	+/- 5% de la température initiale lorsqu'elle est spécifiée, sauf indication contraire
La longueur d'onde de détection	Aucune variation admise	Aucune variation admise

Dans cette optique, on peut conclure que la validation est une procédure primordiale toute fois un simple ajustement peut être envisagé dans les limites décrites par les pharmacopées afin d'éviter le recours à une revalidation.

Deuxième partie :
Expérimentation

Chapitre V:
Données générales

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre V: Données générales

Notre court passage au laboratoire national de contrôle qualité des produits pharmaceutiques, que nous présenterons plus loin, a été pour nous une véritable projection dans le monde du travail et une opportunité riche en expériences couronnées par un stage pratique de deux mois qui nous a permis une meilleure compréhension et juste appréciation des procédures de contrôle qualité des médicaments.

1-Présentation du site de stage



Figure 1.28: Laboratoire national de contrôle qualité des produits pharmaceutiques (originale).

LE LABORATOIRE NATIONAL DE CONTRÔLE QUALITÉ DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES LNCPP est un établissement public à caractère administratif, placé sous la tutelle du ministère chargé de la santé selon le décret exécutif n°93-140 du 14 juin 1993 portant création, organisation et fonctionnement de cette structure[75][77]

Il a pour mission principale le contrôle de la qualité et l'expertise de produits pharmaceutiques qui comprennent des médicaments sous différentes formes galéniques, et des dispositifs médicaux.

Il effectue différentes missions dans le cadre de la réalisation de son activité principale qui est d'assurer la qualité des produits pharmaceutiques, il est chargé de:

-L'évaluation des dossiers techniques des produits pharmaceutiques soumis à l'enregistrement

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre V: Données générales

- Contrôle physico-chimique et microbiologique des produits pharmaceutiques selon des référentiels prédéfinis conformément aux spécifications fournies dans le bulletin d'analyse du produit en question.
- Audit des laboratoires pharmaceutiques dans le but de les valider.
- Re-contrôle des produits pharmaceutiques soumis à une expertise.
- Contrôle des produits pharmaceutiques soumis à l'enregistrement [75][77].

2-Organisation du Laboratoire National de Contrôle Qualité des Produits Pharmaceutiques

Notre stage auprès du LNCPP s'est étalé sur deux mois, au niveau du service de chimie, cependant d'autres services le composent:

- Service de chimie: qui s'occupe du contrôle physico-chimique des produits pharmaceutiques, soumis à l'enregistrement et de produits soumis au contrôle systématique.
- Service de microbiologie: qui s'occupe du contrôle microbiologique des médicaments et des dispositifs médicaux.
- Service de pharmacotechnie: qui s'occupe des tests de dissolution des comprimés, des gélules et des suppositoires.
- Service département des laboratoires: qui assure la distribution de tâches aux différentes services techniques, la récolte des bulletins d'analyse des produits concernés.
- Service technico-réglementaire: qui assure la réception des dossiers techniques de produits et d'échantillon à contrôler.
- Service de toxicologie: où des études toxicologiques sur animaux et cultures cellulaires sont faites [75] [77].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre V: Données générales

3-Problématique

Au cours de notre stage au niveau du laboratoire national de contrôle qualité de produits pharmaceutiques, une problématique nous a été posée concernant le dosage d'un médicament anti-arythmique par l'HPLC le Chlorhydrate d'Amiodarone 200mg en comprimé.

Dans la détermination de la teneur en Chlorhydrate d'Amiodarone par l'HPLC dans le produit étudié 200mg, une déviation du facteur de symétrie du pic chromatographique a été relevée.

Plusieurs paramètres ont une grande influence sur la séparation et la résolution en chromatographie liquide haute performance (HPLC), donc sur la forme du pic chromatographique et par conséquent sur le facteur de symétrie (A_s).

Une déviation du pic chromatographique appelée une trainé est observée et matérialisée par un facteur de symétrie supérieur à 2.

Face au problème rencontré, nous avons réalisé divers essais au cours de notre stage, dans le but de réduire le facteur de symétrie du pic chromatographique tout en gardant conformes les autres paramètres dits de suitability.

Ces essais ainsi que les résultats seront détaillés dans cette partie du présent mémoire.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200mg

Chapitre V : Données générales

4-Objectif

L'objectif de cette étude s'inscrit dans le but général d'optimiser une méthode de séparation du Chlorhydrate d'Amiodarone Cp de 200 mg par la chromatographie liquide haute performance (HPLC), tout en faisant le point sur de multiples paramètres sur lesquels il est possible d'interagir et par conséquent l'obtention d'un facteur de symétrie acceptable, qui représente un paramètre fondamental dans la conformité du système de dosage par la HPLC.

L'intérêt de la notion de facteur de symétrie est de nous renseigner sur l'efficacité de la séparation et est un des critères de conformité du système chromatographique.

Notre travail consistera à effectuer un ensemble de changements sur les divers paramètres chromatographiques, afin de diminuer la rétention du Chlorhydrate d'Amiodarone par la phase stationnaire et d'optimiser la séparation:

-Paramètres stationnaires: Le type, la longueur de la colonne et le diamètre des particules.

-Paramètres dynamiques: La proportion du solvant de la phase mobile, le débit de la phase mobile (PM), l'addition du solvant modificateur qui est le triéthylamine (TEA) à la PM.

Par le bref exposé, dans le présent chapitre nous nous sommes intéressées à notre site de stage qu'est le laboratoire national de contrôle qualité des produits pharmaceutiques (LNCPP).

Chapitre VI:

*Mode opératoire et résultat avant
optimisation*

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

Le dosage de la teneur du Chlorhydrate d'Amiodarone dans le produit étudié dosé à 200 mg par HPLC doit se faire selon un protocole préalablement établi dans le dossier technique du produit ceci en utilisant des méthodes, un matériel et des critères de conformité prédéfinis. Un exemple de résultat obtenu lors du dosage est exposé dans le présent chapitre.

1. Mode opératoire

1.1 Matériel

Nous avons réalisé le dosage chromatographique du Chlorhydrate de l'Amiodarone avec des équipements qualifiés, calibrés et étiquetés. La verrerie utilisée pour le dosage est de qualité requise et les réactifs employés sont tous de grade HPLC.

1.1.1 Appareil HPLC

Les analyses sont effectuées à l'aide d'une chaîne HPLC de marque WATERS E2695 couplée à un détecteur UV de marque WATERS E2489 équipé d'un injecteur automatique, guidé par le logiciel d'acquisition, de traitement et de gestion des données chromatographiques Empower^{TM3} WATERS et à l'aide d'une chaîne HPLC du marque PERKIN ELMER avec un détecteur UV. Visible.



Figure1.29: Appareil d'HPLC(Originale)

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

1.1.2 Balance analytique

De marque OHAUS Calibré au préalable avant l'utilisation.

- Date de Vérification : 14-10-18.
- date de requalification: 13-10-19.

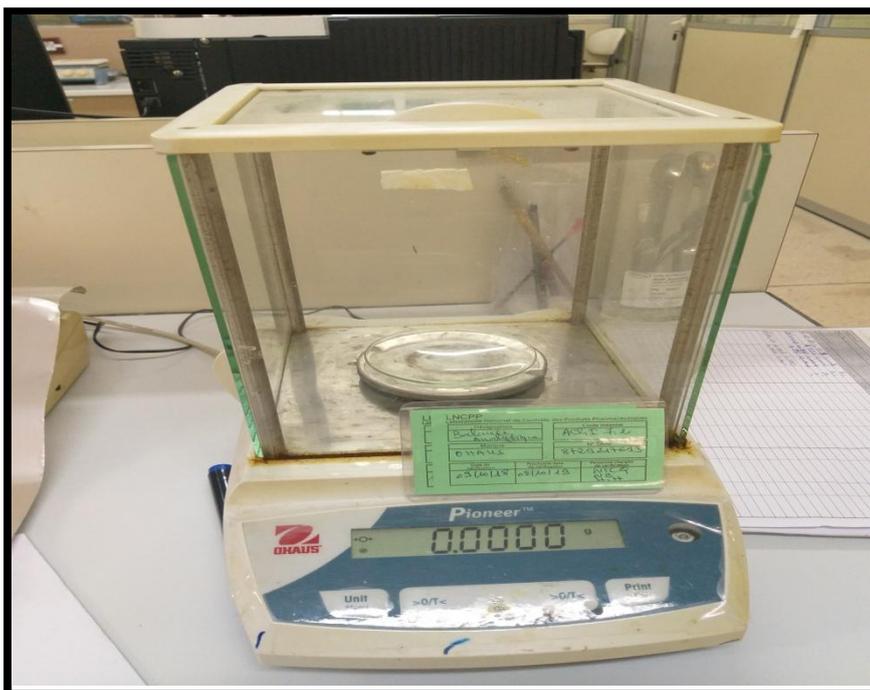


Figure 1.30 : Balances analytiques (originale). ▪

1.1.3 Bain ultrason de marque FALG



Figure 1.31: Bain ultrason (originale).

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

1.1.4 pH mètre de marque Hanna



Figure 1.32: pH-mètre. (Originale)

1.1.7 Verreries de non précision (stérilisables à la chaleur):

Erlen, béchers, mortier et pilon.

1.1.8 Verreries de précision

- Eprouvette gradué (500ml, 1000ml) classe B en verre.
- Fioles jaugés (50ml, 200ml, 500ml).
- Pipettes graduées et jaugées.



Figure 1.33: Verreries classe B (originale)

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

1.1.9 Autres

- Filtre à seringue 0.45 μ m.
- Vials de 2ml de marque WATERS.
- Pissette pour l'eau distillée.
- Spatules et sabot pour peser.

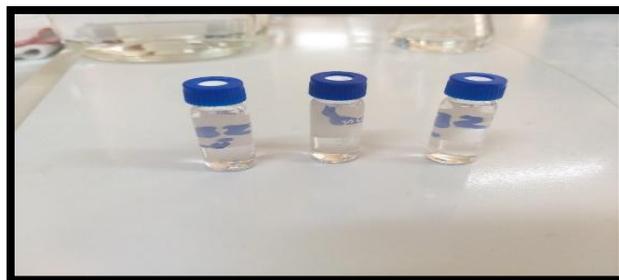


Figure 1.34: Vials de 2ml (originale) ▪

1.2 Réactifs

Les solvants employés pour le dosage du Chlorhydrate de l'Amiodarone sont tous de haute pureté, d'absorbance UV et IR transparente et un très faible niveau d'évaporation résiduelle car la qualité de ces réactifs a une influence sur le succès du procédé analytique et sur la fiabilité des résultats obtenus.

1.2.1 Acétonitrile (ACN) grade HPLC

L'acétonitrile employé est de marque PanReac® AppliChem, fait par ITW Reagents sous un code de produit 1881, la figure suivante montre les informations relatives à l'emploi de l'acétonitrile.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

- S16** Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelle.
- S36/37** Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.
- R11** Facilement inflammable.
- R20/21/22** Nocif par inhalation par contact avec la peau et par ingestion.
- R36** Irritant pour les yeux.

Figure 1.35: Information relatives à l'emploi de l'acétonitrile [72].

Les propriétés physico-chimiques de l'acétonitrile sont regroupées dans la figure suivante:

Dénomination: Acétonitrile.
Formule moléculaire: CH ₃ CN.
Masse molaire: 41.05 g/mol.
Densité: 0.781 kg/l.
Aspect: liquide.
Couleur: incolore.
Point de fusion: 80-82C°.
Solubilité: miscible avec l'eau.
Stabilité chimique: sensible à la chaleur.
Condition de stockage: récipient bien fermé dans un local bien aéré, la manipulation se fait sous une hotte aspirante.

Figure 1.36: Propriétés physico-chimique de l'acétonitrile [72].

1.2.2 Potassium dihydrogénophosphate KH₂PO₄

Le potassium dihydrogénophosphate employé est de marque PanReac[®] AppliChem fait par ITW Reagents sous un code de produit 131509. Les propriétés physicochimiques de KH₂PO₄ sont regroupées dans la figure suivante:

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

Dénomination: Potassium dihydrogénophosphate ou potassium phosphate monobasique.

Formule moléculaire: KH_2PO_4 .

Masse molaire: 136.09 g/mol

Aspect: solide (sous forme de petits cristaux)

Couleur: blanche

Point de fusion: 252 C°.

Solubilité: soluble dans l'eau (222 g/l dans l'eau à 20C°).

Condition de stockage: récipients bien fermés à température ambiante et ambiance sèche.

Figure 1.37: Propriétés physico-chimique de Potassium dihydrogénophosphate[72].

1.2.3 Triéthylamine TEA

Le triéthylamine employé est de marque PanReac[®] AppliChem fait par ITW Reagent sous un code de produit 3542. La figure suivante montre les informations relatives à l'emploi du triéthylamine.

R35 Provoque de graves brûlures.

R20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.

R11 Facilement inflammable.

S29 Ne pas jeter les résidus à l'égout.

S26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S16 Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles.

S3 Conserver dans un endroit frais.

S36/37/39 Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

S45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).

Figure 1.38: Information relatives à l'emploi du Triéthylamine[72].

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

Les propriétés physicochimiques du TEA sont regroupées dans la figure suivante:

Dénomination: Triéthylamine (N,N-Diéthylamine).
Formule moléculaire: C ₆ H ₁₅ N.
Masse molaire: 101.19 g/mol.
Aspect: liquide
Couleur: incolore
Point de fusion: 90C°
Solubilité: soluble dans l'eau (133 g/dans l'eau 20C°)
Conditions de stockages: récipient fermé, dans un local bien aéré à température ambiante et éloigner de toute source d'ignition et de chaleur.

Figure 1.39: Propriétés physico-chimique du Triéthylamine [72].

1.2.4 Standard Chlorhydrate de l'Amiodarone de purté 99,8%

1.2.5 Eau purifié

Le tableau suivant montre le bulletin de contrôle microbiologique et de contrôle physicochimiques.

Tableau 1.17: Bulletin de contrôle microbiologique et de contrôle physicochimique.

Bulletin de contrôle microbiologique		Bulletin de contrôle physicochimique					
Germes aérobies totaux	Pseudomonas aerogenosa	Aspect conforme	Conductivité à 20C°	pH	Substances oxydables	Nitrates	Métaux lourds
UFC/ml <100	Négatif	Incolore, inodore, insipide	< 4.3 µS/ml	Entre 5 et 7	Conforme	< 0.2 ppm	< 0.1 ppm

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

1.3 Méthode

La méthode effectuée dans ce travail pour la détermination de la teneur en Chlorhydrate d'Amiodarone dans le PF est la méthode RP-HPLC. C'est une méthode utilisant un régime isocratique avec un bas pH qui s'oppose à la basicité de la molécule.

1.3.1 Conditions opératoires

Les conditions opératoires sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 1.18 : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg.

Paramètre chromatographiques	Conditions chromatographiques
Débit d'élution	2 ml/ min
Volume d'injection	20 μ l
Longueur d'onde de détection UV	254 nm
Temps d'analyse	10 min
Colonne chromatographique	Nucléosil 120.10 C ₁₈ 25cm \times 4,6mm \times 10 μ m



Figure 1.40 : Colonne C18 de 25cm (originale).

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

1.3.2 Protocole de la méthode

1.3.2.1 Préparation de la phase mobile

La phase mobile est constituée de 40% d'une solution tampon à base de phosphate de potassium monobasique KH_2PO_4 à 0,1M dissout dans l'eau distillée et de 60% d'un solvant organique qui est l'acétonitrile

1) Préparation de la solution tampon (200 ml de KH_2PO_4 à 0,1M)

On a pesé une masse égale à 2,72g de KH_2PO_4 dans une fiole de 200 ml, puis on a versé de l'eau distillé jusqu'au le trait de jauge.

Calcul de la masse de KH_2PO_4 nécessaire :

$$\begin{aligned} C_{\text{KH}_2\text{PO}_4} \cdot V_{\text{fille}} &= m/M && \longrightarrow && m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} &= C_{\text{KH}_2\text{PO}_4} \cdot V_{\text{fille}} \cdot M \\ & && && &= 0,1 \times 0,200 \times M \\ & && && &= 2,72\text{g de } \text{KH}_2\text{PO}_4 \end{aligned}$$

2) Préparation de 500 ml de la phase mobile

La phase mobile est un mélange de solution tampon et d'un solvant organique. Après la préparation de 200 ml de KH_2PO_4 on verse cette solution dans une fiole de 500 ml, puis on ajoute un volume égal à 300 ml de l'acétonitrile.

Le mélange est placé dans le bain ultrasons pendant 5 min puis filtré sur un filtre de 0,45 μm . A l'aide d'un pH mètre préalablement calibré sur trois valeurs de pH on mesure le pH de la solution, la sonde est lavée par le KOH puis plongé dans des solutions étalons (pH=4 et pH=7 et pH=10) Au moment de l'ajustement la sonde est plongée dans la solution en vue de mesurer le pH de la phase mobile avant qu'elle serve à la préparation de la solution de standard, la valeur du pH affichée est de 5,53.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

1.3.2.2. Préparation de la solution standard

On pèse 162.5 mg du STD à l'aide d'une balance analytique préalablement calibrée que l'on met dans une fiole jaugée à 50ml on complète au trait de Jauge avec la PM. On met la fiole dans un bain à ultrason pendant 5min, puis on fait une dilution au 1/10^{ème}.

On remplit la vial avec la solution finale préparée à l'aide d'une seringue munie d'un filtre seringue (0,45µm) on injecte six fois la même vial pour la réalisation du système de suitabilité en notant le facteur de symétrie As.

1.3.2.3. Préparation de la solution d'essai

On a broyé dix comprimés de produit étudié (Chlorhydrate d'Amiodarone) à l'aide d'un mortier puis, on a pesé une prise d'essai équivalente à 162,5mg en Chlorhydrate d'Amiodarone et on la mettre dans une fiole de 50ml.

On dissout la prise d'essai avec la phase mobile préalablement préparée, que l'on met dans le bain ultrasons. On a préparé une dilution de 1 /10 de la solution dans la phase mobile et filtré cette solution à l'aide d'un filtre sérique à 0.45µm.

1.4 Vérification des paramètres de suitabilité (conformité du système)

Reproductibilité

On a : - fait 3 à 6 injections de solution standard S1.

-mesuré la surface de chaque pic, l'écart type (RSD %) des aires des pics des solutions standard S1 ne doit pas dépasser 2,0%.

Contrôle des standards

La vérification des facteurs de réponse des pics des solutions standard S1 et solution S2 en calculant l'écart type S1/S2 doit être inférieure à 2%.

Efficacité

On a calculé le nombre de plateaux théoriques N de la colonne en utilisant le pic du Chlorhydrate d'Amiodarone. N ne doit pas être inférieur à 3500.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

✚ Asymétrie du pic

Le paramètre As ne doit pas dépasser 2.

Le système est à tester avant tout essai, afin de garantir une bonne séparation chromatographique et de bons résultats fiables, les quatre paramètres cités ci-dessus doivent impérativement répondre aux normes établies et exigées par la procédure de dosage du dossier pharmaceutique [45].

2. Résultat du dosage avant optimisation

Lors de notre stage, dans la détermination de la teneur du produit étudié en Chlorhydrate d'Amiodarone une déviation du facteur d'asymétrie a été relevée, comme l'illustre le tableau 2.19 du dosage par HPLC ci-dessous où le facteur de symétrie du pic chromatographique du principe actif est supérieur à ($As > 2$), donc non conforme, ainsi un des paramètres de suitability n'est pas vérifié.

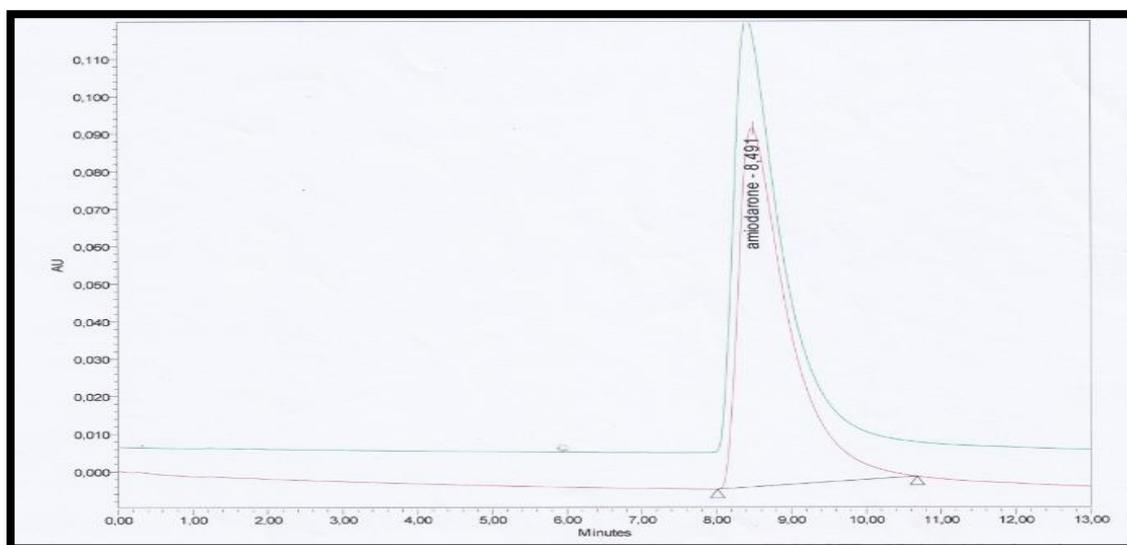


Figure 2.41: Chromatogramme de dosage du Chlorhydrate d'Amiodarone avant optimisation (**originale**).

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du chlorhydrate d'amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

✚ Paramètres de suitabilité :

Tableau 2.19 : Paramètres de suitabilité avant optimisation

Moyenne des valeurs et % RSD pour 6 injections	Temps de rétention $t_{R(\min)}$	Aire du pic A	Nombre de plateaux théoriques N	Facteur de symétrie A_s
Moyenne	8,49	6289316.5	3877.8	3.5
% RSD	0.15	0.29	0.42	0.78

3. Interprétation

Les résultats du dosage obtenus dans les conditions normales montrent une valeur très élevée de facteur de symétrie (A_s) qui dépasse la norme (>2) et cela se manifeste dans le chromatogramme correspondant au dosage effectué par une trainé de pic qui est expliquée par une forte affinité du Chlorhydrate de l'Amiodarone avec les groupements silanols résiduels de la phase stationnaire.

Cette affinité est expliquée d'une part par sa structure chimique dans laquelle on remarque qu'elle est formée d'une grosse partie hydrophobe (trois cycles) sur laquelle est greffée une petite chaîne alkyle se terminant par des groupements éthylamine.

Donc dans une colonne C_{18} où la phase stationnaire est hydrophobe ; le Chlorhydrate de l'Amiodarone sera fortement retenu. D'autre part, cette affinité peut être expliquée par la nature base protonée du Chlorhydrate de l'Amiodarone (R_3-NH^+) qui a tendance à se fixer sur les groupements silanols libres $Si-O^-$ de la phase stationnaire, ce qui retarde son élution en un temps requis d'où une déviation de pic chromatographique du dosage de Chlorhydrate de l'Amiodarone et par conséquent l'apparition d'une trainée.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VI: Mode opératoire et résultat avant optimisation

Face à ce problème, nous avons réalisé différents essais dans le but de diminuer le facteur de symétrie du pic chromatographique du PA As, As étant donné par la formule suivante :

$$As = W_{0.05}/2d$$

[44]

- $W_{0.05}$ = Largeur du pic au vingtième de sa hauteur.
- d = Distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur [44].

Notre travail consistera donc à essayer de valider le test de conformité du système chromatographique en diminuant le facteur de symétrie et donc d'améliorer la séparation de notre molécule et ce en agissant sur les différentes conditions chromatographiques.

On a conclu que le strict respect des normes des paramètres de conformité internes est impératif pour la crédibilité des résultats.

Au cours de notre stage, une déviation d'As a été relevée remettant en cause la conformité du système chromatographique et l'efficacité de la séparation.

Pour ces motifs une optimisation est réalisée.

Chapitre VII:

*Optimisation du facteur d'asymétrie du
pic chromatographique*

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

Le facteur de symétrie du pic chromatographique étant lié à de nombreux paramètres, nous avons procédé à différents essais dans le but de l'optimiser

Le raisonnement suivi ainsi que les résultats obtenus dans chacun de ces essais sont détaillés dans le présent chapitre.

1. Essais réalisés

1.1 Modification de la longueur de la colonne

1.1.1 Protocole

On a injecté six fois la vial de la solution de standard de Chlorhydrate d'Amiodarone préparée en utilisant les mêmes conditions chromatographiques sauf que l'on modifie la longueur de la colonne qui passe de L=25cm à L=15cm

1.1.2. Résultats

Les chromatogrammes de la solution Chlorhydrate de l'Amiodarone enregistré dans les conditions chromatographiques: PM { KH_2PO_4 à 0,1M-ACN (40/60: V/V)} avec une colonne de longueur L=15 cm est représenté dans la figure suivante.

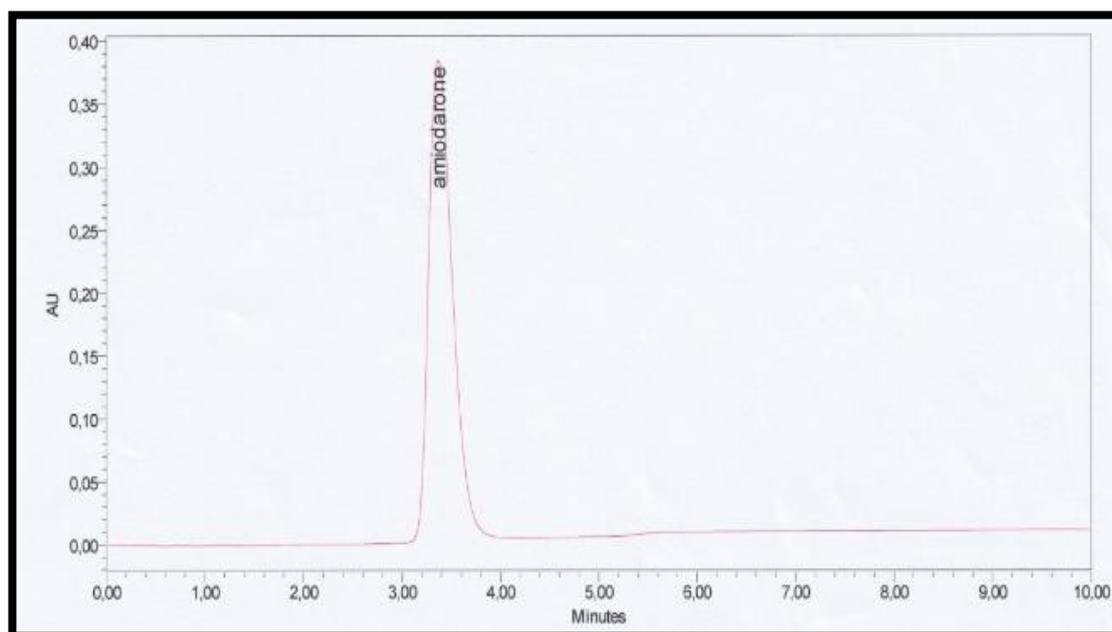


Figure 2.42 : Chromatogramme avec utilisation d'une colonne de 15 cm (originale)

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

Tableau 1.20 : Paramètres de suitabilité après utilisation d'une colonne avec L=15cm(**originale**).

Moyenne des valeurs et % RSD pour 6 injections	Temps de retention $t_{R(\min)}$	Aire du pic A	Nombre de plateaux théoriques N	Facteur de symétrie As
Moyenne (L=15cm)	3.379	6372509.453	3687	1.389
% RSD	0.35	0.22	0.62	0.2

1.1.3 Interprétation

D'après le chromatogramme correspondant et les résultats du système de suitabilité figurant dans le tableau ci-dessus (**Tableau 1.21**), on remarque une réduction plus remarquable de la valeur du facteur de symétrie ($As=3.5$ à $As=1.389$) qui se traduit par un pic chromatographique plus symétrique, cela est expliqué par un séjour moins long dans cette colonne par rapport au cas de la colonne avec L=25cm. Cette colonne est plus courte, a un nombre de sites accessibles de silanols résiduels réduit d'où le Chlorhydrate d'Amiodarone se fixe sur moins de sites des silanols résiduels. La phase stationnaire qui se traduit par un facteur de symétrie conforme à la norme exigée par la procédure interne de dosage du produit.

1.2 Modification de débit de la phase mobile

1.2.1 Protocole

On a injecté six fois la vial de la solution standard du Chlorhydrate d'Amiodarone préparée en utilisant les mêmes conditions chromatographiques avec une utilisation d'un débit égal à 2.5ml/min.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

1.2.2 Résultats

Le chromatogramme de la solution Chlorhydrate de l'Amiodarone enregistré dans les conditions chromatographiques: PM { KH_2PO_4 à 0,1M-ACN (40/60: V/V)} avec un débit égal à 2.5ml/min est représenté dans la figure suivante.

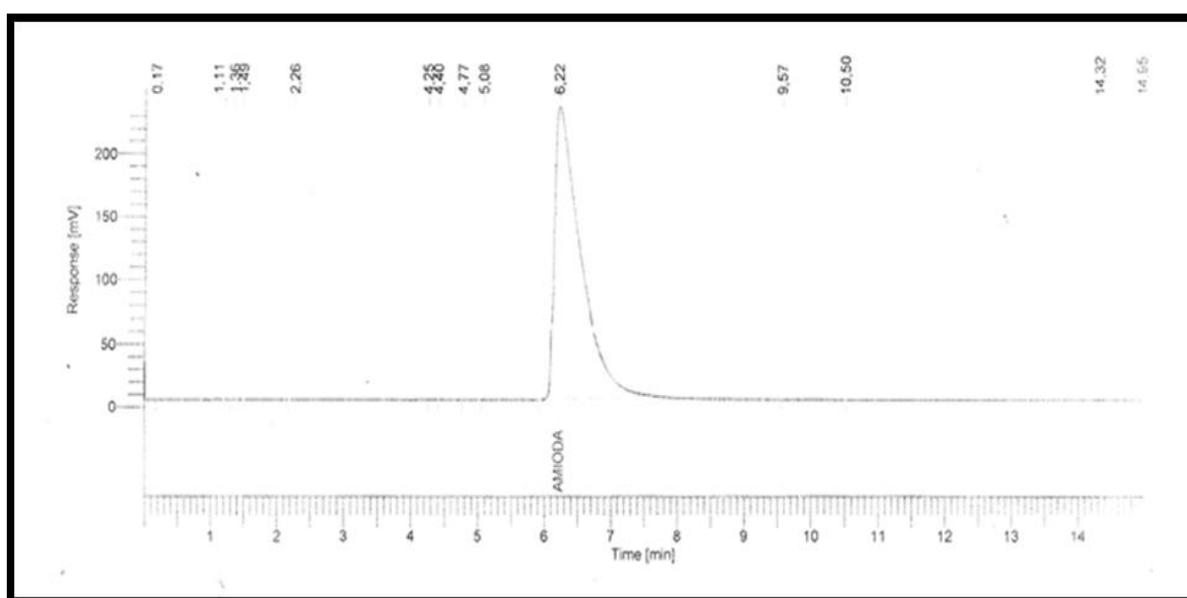


Figure 2.43:Chromatogramme obtenu à partir d'un débit égale à 2,5 ml/min (originale).

Tableau 1.21 : Paramètres de suitabilité après utilisation un débit = 2.5ml/min (originale).

Moyenne des valeurs et % RSD pour 6 injections	Temps de rétention (min) t_R	Aire du pic A	Nombre de plateaux théoriques N	Facteur de symétrie A_s
Moyenne (F=2.5ml/min)	6,22	6559689.375	3702	1.851
% RSD	0,15	0.77	0,37	0.23

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 m

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

1.2.3 Interprétation:

D'après le chromatogramme correspondant et les résultats du système de suitabilité figurant dans le tableau ci-dessus (**Tableau 1.21**) : le passage d'un débit ($F=2\text{ml/min}$) à un débit ($F=2.5\text{ml/min}$) a permis une diminution du temps de rétention (de 8,49 à 6,22 à 6.834) avec un facteur de symétrie proche de la norme indiqué dans la procédure interne .

Un débit élevé ($F=2.5\text{ml/min}$) provoque une vitesse d'élution rapide ce qui minimise la force d'attraction du Chlorhydrate de l'Amiodarone avec les groupements silanols résiduels de la phase stationnaire. Ainsi le pic chromatographique obtenu est plus symétrique et l'élution de la molécule se fait plus rapidement.

1.3 Modification du pH de la phase mobile

1.3.1 Protocole

Pour préparer une phase mobile à $\text{pH}=4$, on a préparé d'abord 200 ml de KH_2PO_4 et on a ajusté le pH jusqu'à $\text{pH}=4$ à l'aide de l'acide ortho-phosphorique puis on a ajouté 300 ml de l'acétonitrile.

On a injecté six fois la vial de la solution standard de Chlorhydrate d'Amiodarone préparée en utilisant les mêmes conditions chromatographiques avec une utilisation d'une phase mobile à $\text{pH}=4$ au lieu de 5,53.

1.3.2 Résultats

Le chromatogramme de la solution Chlorhydrate de l'Amiodarone enregistré dans les conditions chromatographiques: PM { KH_2PO_4 à 0,1M-ACN (40/60: V/V) } avec une phase mobile à $\text{pH}=4$ est représenté dans la figure suivante.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

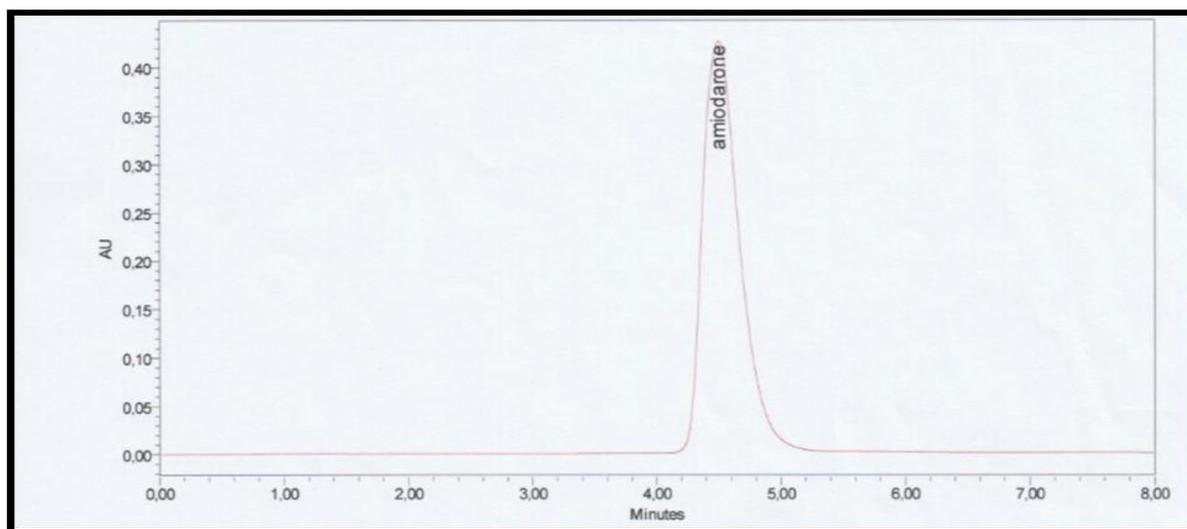


Figure 2.44: Chromatogramme avec une phase mobile est de pH=4 (originale)

Tableau 1.22 : Paramètres de suitabilité après utilisation d'une phase mobile à pH=4 (originale).

Moyenne des valeurs et % RSD pour 6 injections	Temps de rétention t_R (min)	Aire du pic A	Nombre de plateaux théoriques N	Facteur de symétrie As
Moyenne (pH=4)	4,6	6088866	3542	1,42
% RSD	0.2	0.42	0.59	0.7

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

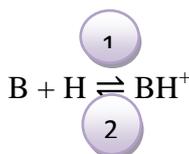
Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

1.3.3 Interprétation

➤ Diminution du pH de la phase mobile à pH=4

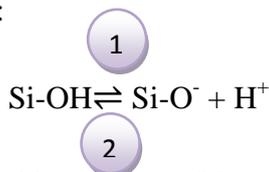
A partir de chromatogramme correspondant et des résultats obtenus, on a constaté que la diminution du pH de la phase mobile fournit une valeur de facteur de symétrie conforme à la norme $As < 2$ cela est expliqué par le fait :

Le Chlorhydrate de l'Amiodarone possède un $pK_a=6,5$ qui régit l'équilibre entre la forme base protonnée et la forme neutre, ce qui signifie que si le $pH < 4,5$ (pK_a-2) le Chlorhydrate d'Amiodarone sera principalement sous la forme R_3-NH^+ donc base protonnée à ce pH selon la réaction:



Le sens 1 est favorisé.

D'autre part, les groupements silanols sont considérés comme des acides faibles avec un pK_a entre 3 et 7 régit par la réaction:



A $pH < 7$ le sens 1 est négligeable et à $pH > 9$ le sens 1 est favorisé, ainsi si on diminue le pH à $pH=4$ le Chlorhydrate d'Amiodarone est sous forme ionisée (R_3-NH^+) et les groupements silanols résiduels sont sous forme neutre (Si-OH).

Ce qui diminue l'affinité du Chlorhydrate de l'Amiodarone avec les groupements silanols résiduels entraînant un pic chromatographique avec une faible trainée ($As < 2$).

Aussi, pour diminuer la forte affinité de Chlorhydrate de l'Amiodarone avec ses groupements, on pourrait également travailler à $pH > 11.4$ (pK_a+2) où les groupements silanols seront sous la forme $Si-O^-$ et notre molécule sous forme neutre. Or cela dépasse largement le domaine de stabilité des colonnes courantes compris entre $pH=2$ et $pH=8$, c'est pourquoi nous avons rejeté cette éventualité.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

1.4 Modification du diamètre des particules de la phase stationnaire

1.4.1 Protocole

On a injecté six fois la vial de la solution standard de Chlorhydrate d'Amiodarone préparée en utilisant les mêmes conditions chromatographiques avec l'utilisation d'une colonne avec une phase stationnaire dont le diamètre des particules est égal à $5\mu\text{m}$.

1.4.2 Résultats

Le chromatogramme de la solution Chlorhydrate de l'Amiodarone enregistré dans les conditions chromatographiques: PM { KH_2PO_4 à 0,1M-ACN (40/60: V/V)} avec une phase stationnaire dont le diamètre des particules égale à $5\mu\text{m}$ est représenté dans la figure suivante.

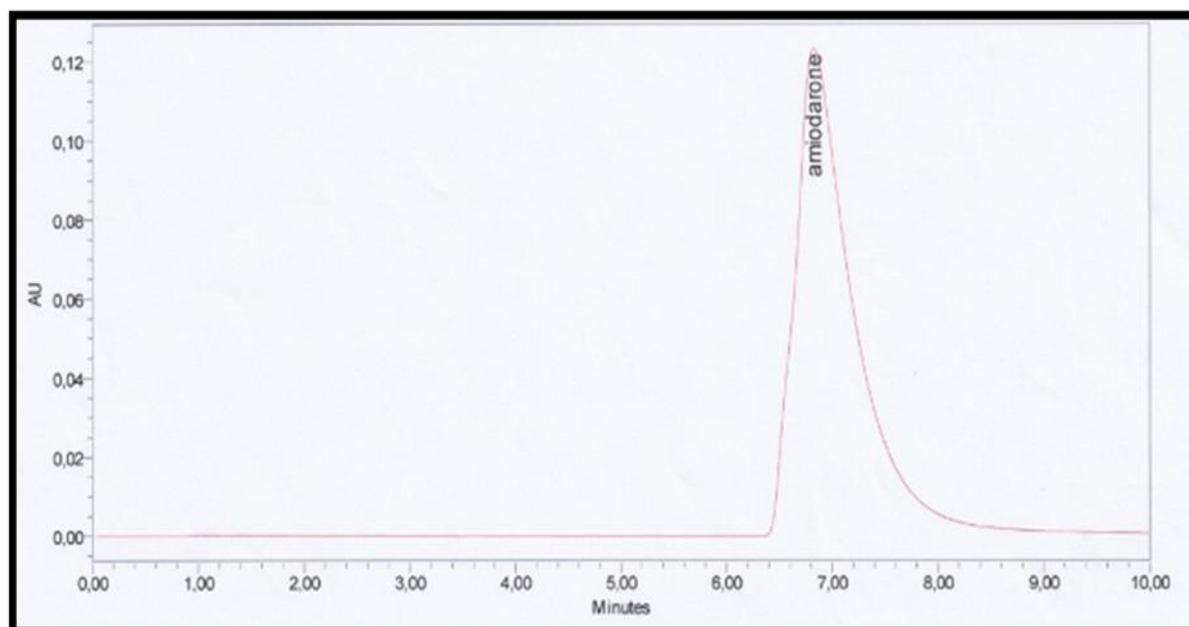


Figure 2.45: Chromatogramme avec une phase stationnaire dont le diamètre des particules égale à $5\mu\text{m}$ (originale)

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

Tableau 1.23 : Paramètres de suitabilité après utilisation d'une phase stationnaire dont le diamètre est des particules égal à 5 μ m (**originale**).

Moyenne des valeurs et % RSD pour 6 injections	Temps de rétention $t_{R(\min)}$	Aire du pic A	Nombre de plateaux théoriques N	Facteur de symétrie As
Moyenne	7,68	6711863.103	3501,2	2.435
% RSD	0.6	0,11	0,38	0,2

1.4.3 Interprétation

A partir du chromatogramme correspondant et les résultats obtenus, la diminution du diamètre des particules remplissant la phase stationnaire de 10 μ m à 5 μ m a permis une réduction remarquable du facteur de symétrie (de 3.5 à 2.435) mais cette valeur reste supérieure à la norme $As < 2$.

L'utilisation de colonne avec un faible diamètre des particules contribue à une réduction de l'effet multi trajectoire, de l'espace entre les particules donc une diminution du volume mort propre au support. La surface de contact avec l'analyte est aussi minimisée et est plus rapide ce qui entraîne une diminution d'interaction entre l'analyte et la phase stationnaire et donc diminution de la rétention du Chlorhydrate d'Amiodarone par les silanoles résiduels.

Cette modification a permis une bonne amélioration de la forme du pic Chromatographique de l'Amiodarone mais nécessite l'association avec d'autre modification pour l'obtention d'un facteur de symétrie dans la norme exigée $As < 2$

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

1.5 Modification des proportions de la phase mobile

1.5.1 Protocole

- ✓ **Préparation d'une phase mobile avec 30% de phosphate monobasique KH_2PO_4 et 70% de l'acétonitrile ACN:**

Au début, on a préparé 150ml de la solution tampon (corresponde à 30% de KH_2PO_4), on a pèsé une masse égale à 2.72mg et on la mettre dans une fiole de 150ml puis on complète au trait de jauge avec de l'eau distillée.

On a pris un flacon de phase mobile vide et on a versé la solution préparée de KH_2PO_4 puis on a ajouté 350 ml de l'acétonitrile. Le flacon du mélange est placé dans le bain ultrason pendant 5min.

On a pesé une masse de 162.5mg de standard du Chlorhydrate de l'Amiodarone, on a mis cette masse dans une fiole de 50 ml puis on l'a dissout avec la phase mobile préparée et on a fait une dilution au 1/ 10 de la solution dans de la phase mobile.

On a rempli une vial de la solution finale et on a injecté six fois la même vial pour faire le système de suitabilité.

1.5.2.Résultats

Le chromatogramme de la solution Chlorhydrate de l'Amiodarone enregistré dans les conditions chromatographiques: PM { KH_2PO_4 à 0,1M-ACN (30/70: V/V) } est représenté dans la figure suivante.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

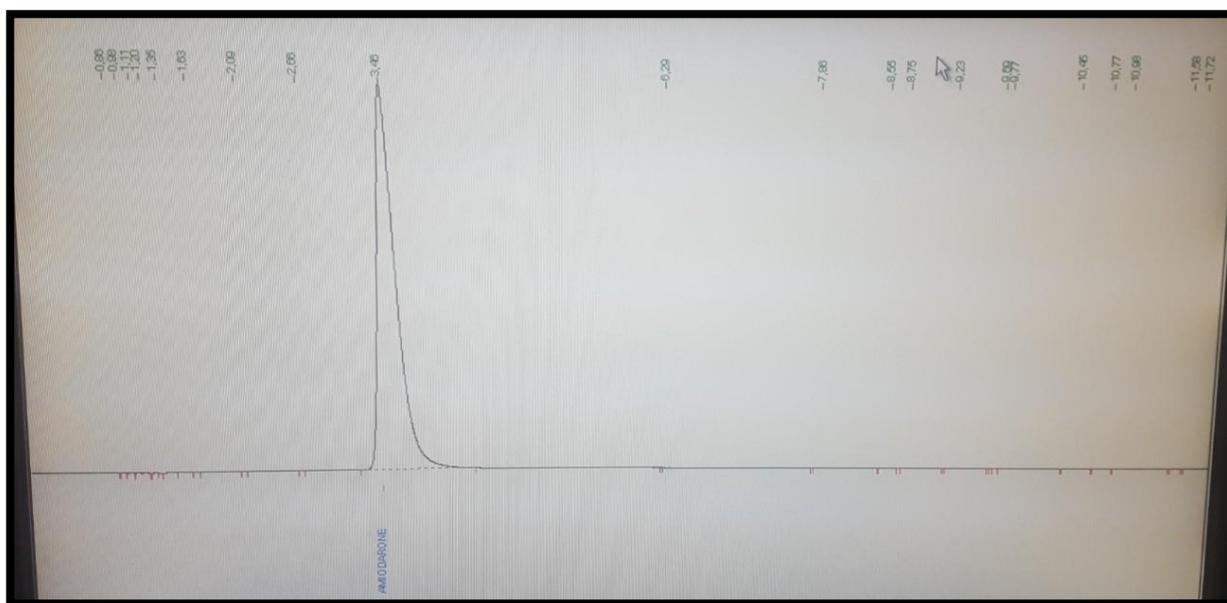


Figure 2.46:Chromatogramme avec PM {KH₂PO₄ à 0,1 M-ACN (30/70 :v/v)}(originale).

Tableau 1.24: Paramètres de suitabilité après utilisation d'une phase mobile {KH₂PO₄ à 0,1M-ACN (30/70: V/V)}(originale).

Moyenne des valeurs et % RSD pour 6 injections	Temps de rétention $t_{R(\text{min})}$	Aire du pic A	Nombre de plateaux théoriques N	Facteur de symétrie As
Moyenne	3.43	663043.12	3725.99	2.36
% RSD	0.42	0.62	0.34	0.3

1.5.3. Interprétation

D'après le chromatogramme correspondant et les résultats figurant dans le tableau ci-dessus l'utilisation d'une proportion plus élevée de l'acétonitrile dans la composition de la phase mobile a permis une diminution marqué du facteur de symétrie (3.5 à 2.36) qui se rapproche à la norme ($As < 2$).

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

La surface de contact entre la partie hydrophobe de la molécule et celle de la phase stationnaire détermine la rétention de l'analyte et comme l'Amiodarone a une large surface hydrophobe représentée par les trois cycles (un cycle benzofurane et un cycle bènzenediiodé), elle est plus retenue par la phase stationnaire ce qui aboutit à une valeur élevée de facteur de symétrie. L'augmentation de la proportion du solvant organique a permis de décrocher la molécule de la phase stationnaire et de minimiser l'interaction non désirée entre notre composé et les groupements silanols résiduels.

Donc une réduction de la force de rétention et par conséquent une meilleur élution du Chlorhydrate d'Amiodarone sont observées, ce qui améliore la forme du pic chromatographique

1.6 Ajout du solvant modificateur dans la PM

1.6.1 Protocole

On a préparé une phase mobile de 500ml qui contient 200ml de solution tampon KH_2PO_4 , la solution obtenue est mise dans une fiole de 500ml et on a ajouté 295ml de l'acétonitrile puis 5ml du solvant modificateur le triéthylamine (TEA). La PM préparée est placée dans le bain ultrason pendant 5 min puis la solution est filtrée à l'aide d'un filtre (0.45 μm).

La solution de Chlorhydrate de l'Amiodarone est préparée par la même procédure que dans l'étape avant optimisation, puis on a mis la prise d'essai dans une fiole de 50ml et on a dissous avec la nouvelle phase mobile préparée. On a fait une dilution de 1/10ème dans la nouvelle phase mobile et on la place dans le bain ultrason.

On a rempli une vial de la solution finale à l'aide d'un filtre à seringue (045 μm) et on injecte six fois la même vial pour faire le système de suitability.

1.6.2 Résultats

Le chromatogramme de la solution Chlorhydrate de l'Amiodarone enregistré dans les conditions chromatographiques: PM { KH_2PO_4 à 0,1M-ACN (40/60: V/V) } avec l'ajout d'un solvant modificateur le Triéthylamine (TAE) est représenté dans la figure suivante.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

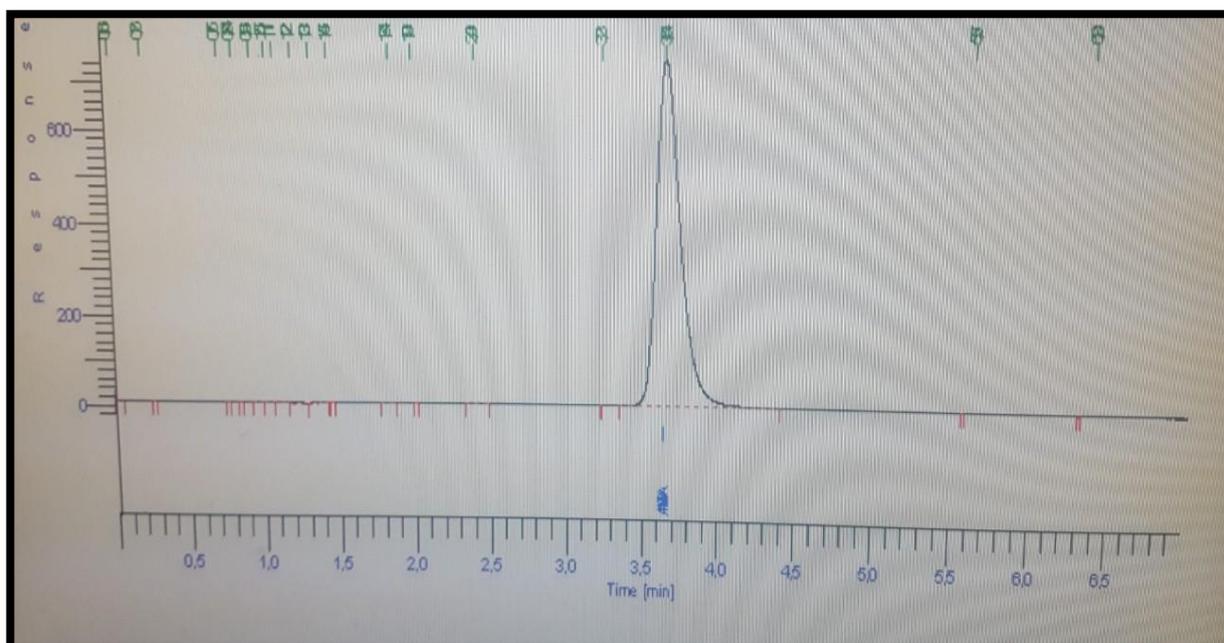


Figure 2.47: Chromatogramme après ajout de Triéthylamine (TEA) (originale).

Tableau 1.25: Paramètres de suitabilité après l'addition de la solution de Triéthylamine (TEA)(originale).

Moyenne des valeurs et % RSD pour 6 injections	Temps de rétention $t_{R(\min)}$	Aire du pic A	Nombre de plateaux théoriques N	Facteur de symétrie As
Moyenne	3.61	6153186	3619.5	1.557
% RSD	0.1	0.6	0.24	0.2

1.6.3 Interprétation

D'après le chromatogramme correspondant et les résultats figurant dans le tableau ci-dessus, l'addition du triéthylamine à la phase mobile provoque une diminution plus marquée du facteur de symétrie ($As=3.5$ à $As=1.557$) qui rentre dans la norme $As < 2$

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

Le triéthylamine (TEA) possède une forte affinité aux groupements silanols résiduels libres de la phase stationnaire par rapport aux composés basiques et comme notre molécule est une base protonnée, l'ajout du triméthylamine (TEA) qui est une amine chargée positivement entraîne une compétition avec le Chlorhydrate de l'Amiodarone vis-à-vis des sites accessibles des groupements silanols résiduels donc il se fixe à ces sites à la place de Chlorhydrate de l'Amiodarone et par conséquent notre molécule reste libre et sera éluée plus rapidement que dans le cas d'absence de la molécule triéthylamine et le pic obtenu sera donc meilleur et plus symétrique.

1.7 Utilisation de la colonne ODS1

1.7.1 Protocole

On a injecté six fois la vial de la solution de Chlorhydrate d'Amiodarone préparée en utilisant les mêmes conditions chromatographiques, avec l'utilisation d'une colonne chromatographique de type ODS1 de longueur L=250mm.

1.7.2 Résultats

Le chromatogramme de la solution Chlorhydrate de l'Amiodarone enregistré dans les conditions chromatographiques: PM { KH_2PO_4 à 0,1M-ACN (40/60: V/V) } avec l'utilisation d'une colonne de type ODS1 est représenté dans la figure suivante.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

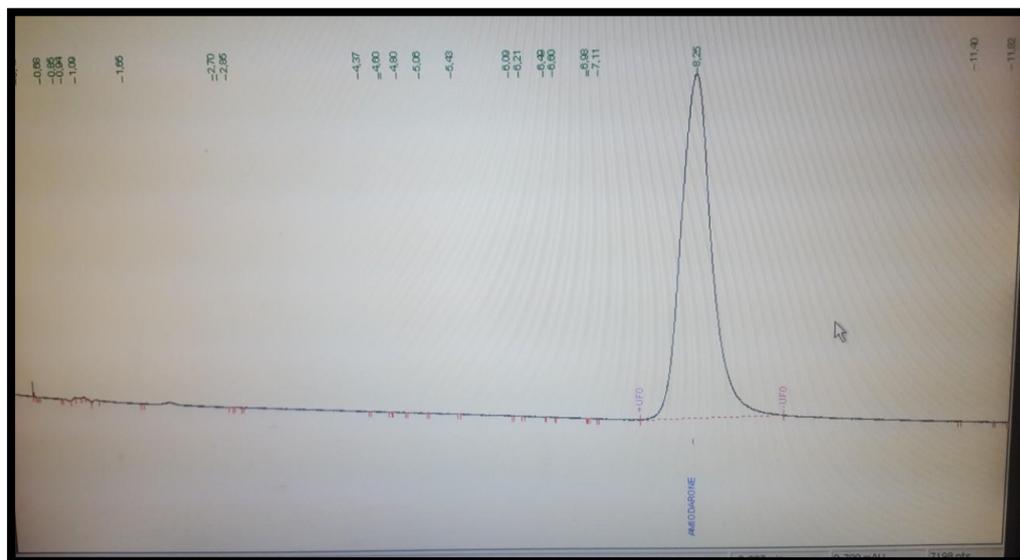


Figure 2.48: Chromatogramme avec utilisation d'une colonne type ODS1 (originale)

Tableau 1.26 : Paramètres de suitabilité après utilisation d'une colonne de type ODS1(originale).

Moyenne des valeurs et % RSD pour 6 injections	Temps de rétention (min) t_R	Aire du pic A	Nombre de plateaux théoriques N	Facteur de symétrie As
Moyenne	8,25	6253187	3261.29	1.981
% RSD	0.15	0.58	0.5	0.3

1.7.3 Interprétation

D'après le chromatogramme correspondant et les résultats figurant dans le tableau ci-dessus, l'utilisation de la colonne ODS1 a permis une diminution marquée de facteur de symétrie ($As=3.5$ à $As=1.981$) par rapport au cas d'utilisation de la colonne C_{18} avant optimisation.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Chapitre VII: Optimisation du facteur de symétrie du pic chromatographique

Les colonnes ODS1 sont connues par un nombre moins élevés de groupements silanols résiduels par rapport à celle des colonnes C₁₈ ce qui entraîne une diminution des interactions secondaires entre le Chlorhydrate de l'Amiodarone et les groupements silanols résiduels, de ce fait notre molécule sera moins retenue par ces groupements et se traduira par un pic plus symétrique avec un meilleur facteur de symétrie ($A_s = 1.981 < 2$)

2. Ajustement et revalidation

Afin d'éviter le recours à la revalidation analytique, certaines des optimisations que nous avons fait rentrent dans le cadre de l'ajustement uniquement et donc ne nécessitent pas de revalidation analytique, alors que d'autres optimisations qui sont dites majeures nécessitent un protocole de revalidation .et ceci en prenant en considération les quatre critères de validation : linéarité, fidélité, spécificité et l'exactitude

Tableau 2.27: Paramètres optimisés ajustable et les paramètres optimisés nécessitant une revalidation [44].

Paramètres optimisés	Nécessite un ajustement	Recours à la revalidation analytique
La longueur de la colonne	×	
Le débit de la phase mobile	×	
pH de la phase mobile		×
Le diamètre des particules de la phase stationnaire	×	
La proportion du solvant de la phase mobile	×	
L'ajout du solvant modificateur le Triéthylamine	×	
L'utilisation de la colonne ODS1		×

Malheureusement, nous n'avons pas réalisé un protocole de revalidation pour les paramètres majeurs faute de temps et de moyens ainsi que la charge de travail au niveau du LNCPP.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC du Chlorhydrate d'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Conclusion générale

De tout ce qui précède, nous tenons à préciser que notre expérience au sein du laboratoire national de contrôle qualité des produits pharmaceutiques LNCPP, a été très instructive et enrichissante à plus d'un titre.

En effet, elle nous a permis de découvrir le monde de l'industrie pharmaceutique et de comprendre l'importance du contrôle qualité dans le cycle de vie du médicament, ainsi que la panoplie des techniques utilisées pour garantir la qualité du produit.

Elle nous a également permis de perfectionner nos connaissances théoriques acquises au cours de notre cursus universitaire, notamment celles concernant les méthodes chromatographiques telle que l'HPLC et les réglementations en vigueur.

Cependant, il est à souligner que face à la problématique qui nous a été posée, nous avons su proposer de nombreuses solutions dans le but d'optimiser le facteur de symétrie du pic chromatographique du dosage du Chlorhydrate d'Amiodarone en comprimé de 200 mg par HPLC.

Parmi les solutions proposées (Débit = 2.5 ml/mn, Proportions de la phase mobile : Tampon 70 V/Méthanol 30 V et $\text{pH}_{\text{phase mobile}} = 4$ modification de la longueur de la colonne $L=15\text{cm}$,diamètre des particule $5\ \mu$; ajout de solvant modificateur triéthylamine , nous avons pu avoir un pic d'une meilleure allure avec un facteur de symétrie qui s'inscrit ou se rapproche de la norme tout en respectant les autres paramètres de conformité du système chromatographique (RSD ,N,tr..),.

Les résultats obtenus étaient très significatifs en termes de nombre de plateaux théoriques qui a largement dépassé le seuil minimal de 3500 (seuil figurant dans le dossier d'enregistrement de ce produit) RSD inférieurs à 2.

Certaines modifications ne s'inscrivant pas dans le cadre des limites de l'ajustement décrites dans les pharmacopées devront impérativement faire l'objet de revalidation analytique de la méthode optimisée, ceci étant nécessaire pour confirmer que la méthode est linéaire, fidèle, exacte et le restera dans le temps.

Résumé

Résumé

Le Chlorhydrate d'Amiodarone est un anti-arythmique de classe III, disponible sous forme de comprimés dosés à 200mg, il possède des propriétés pharmaceutiques et pharmacologiques qui lui justifient son efficacité. Ce produit fini est dosé par l'HPLC lors de son control qualité au niveau du LNCPP. Le chromatogramme obtenu présente une trainé de pic exprimée par un facteur d'asymétrie supérieur à la norme USP ($As < 2$) qui est un paramètre important pour vérifier la conformité du système utilisé. Afin d'améliorer la séparation de la molécule par cette méthode, une gamme de modification est apportée sur les divers paramètres de l'HPLC. Ces essais se sont révélés concluants et propose une solution exploitable permettant de satisfaire aux exigences réglementaires en vigueur. Après l'étape d'optimisation, il est recommandé de revalider la méthode et cela dans le cas où les variations effectuées sont loin de la norme décrite dans les pharmacopées européenne et américaine. Néanmoins, si la limite de variation des conditions chromatographiques est respectée, la méthode est dite ajustée et reste validée et exonéré de la revalidation analytique.

Mots clés : *HPLC , Optimisation, facteur d'asymetrie, chlorhydrate d'amiodarone*

Abstract

Amiodarone Hydrochloride is a Class III anti-arrhythmic drug, available as 200mg tablets, with pharmaceutical and pharmacological properties that justify its efficiency. This finished product is dosed by HPLC during quality control at the National Pharmaceutical Quality Control Laboratory. The resulting chromatogram shows a peak train expressed by an asymmetry factor above the USP standard ($As < 2$), which is an important parameter for verifying the conformity of the system used. In order to improve the HPLC separation of the molecule, a range of modifications is made to its diver parameters. These tests have been shown to be successful and providing a workable solution to meet current regulatory requirements. After the optimization stage, it is recommended that the method be revalidated, in case the variations made are far from the Standard described in the European and American pharmacopoeias. Nevertheless, if the limit of variation is respected in the chromatographic conditions, the method is said to be adjusted and remains validated and exempt from analytical revalidation.

Key words : *HPLC , optimization , asymmetry factor, Amiodarone Hydrochloride.*

الملخص:

امبودارون هيدروكلوريد هو مضاد عدم انتظام ضربات القلب من القسم الثالث متاح على شكل اقراص بسعة 200ملغ. يملك خصائص صيدلية و دوائية تبرز فعاليتها. يتم فحص هذا المنتج النهائي بواسطة التحليل الكروماتوجرافي السائل عالي الاداء خلال مراقبة جودته في المخبر الوطني لمراقبة المواد الصيدلانية. يبرز الكروماتوجرام المتحصل عليه انحراف يعبر عنه عمليا من خلال عامل عدم تناسق اكبر من المعيار الموصوف في الفرماكوبيا الامريكية وهو عامل مهم للتحقق من تطابق النظام المستعمل. من اجل تحسين فصل المنتج بهذه التقنية تم اجراء مجموعة من التعديلات المختلفة. لقد نجحت هذه التجارب في تحقيق النتائج المرجوة وتوفير حل عملي لتلبية المتطلبات التنظيمية الحالية. بعد خطوة التحسين يوصى باعادة التحقق من فعالية الطريقة في الحالة التي تكون فيها التغييرات المحدثة قد تجاوزت المعيار الذي نصت عليه الفرماكوبيا الامريكية و الاوروبية. اما اذا تم احترام حد التبئين للشرو الكروماتوجرافية فان الطريقة مضبوطة و تبقى صحيحة ومعافاة من اعادة التحقق.

الكلمات المفتاحية: الكروماتوجرافي السائل عالي الاداء, امبودارون هيدروكلوريد , عامل عدم تناسق, تحسين .

TERRAI Chahra Terraichahra1994@gmail.com	AMRANI Soumia samupharma21@gmail.com	ZEKKARI Nesrine nesrinephrm125@gmail.com
--	--	--

Références

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC de l'amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Références bibliographiques

Ouvrages et articles

- [1] ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé). Mai 2013. Système Qualité Pharmaceutique (ICH Q10).
- [2] AHUJA Satinder, 1989. Selectivity and delectability Optimization in HPLC, by John Wiley.
- [3] AHUJA Satinder, ROSMUSSEN Henrik, 2007. HPLC Method developpement for pharmaceuticals, separation science and technologies, v. 8. UK: Academy Press.
- [4] AHUJA Satinder, SCYPINSKI Stephen, 200. Handbook of Modern Pharmaceuticals Analysis, separation science and technology, V. 3 USP. Academie Press.
- [5] Association française des enseignants de chimie thérapeutique, 1992. Traité de Chimie Thérapeutique Volume 3, Médicament du système cardiovasculaire.
- [6] BOUKIOUZE, 2006. Démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique, les technologies de laboratoire.
- [7] BURGOT Gwenola, BURGOT Jean-Louis, 2006. Méthodes instrumentales d'analyse chimiques et applications, 2^e édition Paris Lavoisier.
- [8] CALOP Jean et al, 2008. Pharmacie Clinique et Thérapeutique, 3^e édition Paris: Elsevier Masson.
- [9] CAPORAL.J, GUAUTIER et NIVET.J.M, 1992. Guide de Validation analytique Rapport d'une commission SFSTP Méthodologie STP Pharmaceutique Pratique.
- [10] CAZES Jack, 2004. Analytical Instrumentation Handbook, 3^e édition Taylor and François group LLC.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC de l'amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Bibliographie

- [11] Chromatographie en phase liquide, Saint Etienne Ecole des mines.
- [12] Chromatoguide Appendix F. 1, F.20.
- [13] COHEN.Y, JAQUOT.C, 2008. Abrégé de Pharmacologie, Elsevier Masson SAS.
- [14] COLIN F. Poole, 2003.The essence of Chromatography, Elsevier.
- [15] COLOMB. F, HPLC: Principe et Appareillage, Rouen.
- [16] DE GRAVE Jean, BERTHOU François et PROST Michel avec la collaboration de ARPINO Patrick et PROME Jean Claude, 1956. Méthodes Chromatographiques Couplées à la Spectrométrie de Masse (Technologie et application dans les domaines de l'environnement, la pharmacologie et à la biochimie), 1956.
- [17] DONG W.MICHAEL, 2006. Modern HPLC for Practicing Scientists, New Jersey: John Wiley and sons.
- [18] DRUDHOMME.C, 2009 Guide de Médicaments.
- [19] DRUT GREVOZ Guylaine, LAUBRIET Aline, 2007. Reconnaissance et Préparation de Médicaments à l'officine, Maloine.
- [20] DUBEREUIL.P, Introduction à la chromatographie.
- [21] EL BOURAKADI Khadija, 2015-2016, Optimisation et validation d'une méthode de dosage simultané de paracétamol et la caféine dans différentes formes pharmaceutiques : Comprimé, Sachet, et Gélule. Thèse Master Sciences et Techniques : CMBA Chimie des Molécules Bio Actives.
- [22] FRANÇOIS JAN, 2004.Thérapeutique en Cardiologie, Masson Paris.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC de l'amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Bibliographie

- [23] FREINBERG Max, 2009. Labo stat, Guide de Validation des Méthodes Analytiques, Lavoisier.
- [24] Guidance for Industry Q2B validation of analytical procedures: Methodologies, Novembre 1996 ICH.
- [25] Guideline for Industry Text on validation of analytical procedures, ICH-Q2A.March 1995.
- [26] HPLC: Critères de conformité 2000.
- [27] IBN Sina, 1995. Dictionnaire Thérapeutique 2^e édition. Médecine Digest. Diagnostic.
- [28] ICH Guide ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical procedure Text and Methodology Q2.(R1)November 2005.
- [29] KATZ Elena et al, 1998. HPLC, Chromatographic science series, v. 78, Marcel Dekker, Inc.
- [30] KAZAKEVICH Yuri, ROSARIO Lobrutto, 2007. HPLC for Pharmaceuticals Scientists, New Jersey John and Sons.
- [31] KROMIDAZ Stavros, 2006. HPLC Made to Measure, A Practical Handbook for Optimization Wiley-VCH Verlag GmbH.
- [32] KROMIDAZ Stavros, 2016. The HPLC Expert Possibilities and Limits of Modern High Performance Liquid Chromatography, Wiley VCH.
- [33] Leblanc B.Purification des protéines, Université Sherbrooke.
- [34] LECHAT Paul et al, 1990 Pharmacologie médicale, 5^e édition Masson.
- [35] LOUGH J W, WAINER I.W, 1996. High Performance Liquid Chromatography Fundamental Principles and Practice, Chapman & Hall.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC de l'amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Bibliographie

- [36] MENDHAM et al 2008, Analyse Chimique Quantitative de VOGEL, traduction et révision scientifique de la 6^e édition anglaise par Jon Toulle et Moniaque Mottet.
- [37] Méthodes physiques de séparation et d'analyse / Méthodes de dosage des biomolécules, Paris: Université Pierre et Marie Curie.
- [38] Monographie de produit Cordarone (comprimé de chlorhydrate d'amiodarone 200 mg anti arythmique), MD.de Sanofi-Synthélabo fizer Canada Inc., licencié. Date de révision : 3-12-2014.
- [39] Mortier Aspects Théoriques de la séparation Chromatographique.
- [40] MOULIN.M, A. COQUEREL, Pharmacologie, 2^e édition 2002.
- [41] OMS des normes relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF), Partie 2 : Validation WHO/VSQ/97.02.
- [42] O'Neill, Mj, The Merck Index une encyclopédie des produits chimiques, des médicaments et des produits biologiques, 13^e éditions, Whitehorse stations NJ. Mec ad Co, Inc., 2001.
- [43] PERLEMUTER Léon, PERLEMUTER Gabriel, 2015 Guide de Thérapeutique.
- [44] Pharmacopée Européenne neuvième édition, Tome I, 2017.
- [45] Procédé interne dossier technique du SEDACORON[®].
- [46] SALVATOR Fanoli, et al 2013. Liquid Chromatography Applications.
- [47] SANCHEZ Nadine, 1990, Contribution à l'étude de la Désorption Laser In Situ Cas de l'Amiodarone, Thèse de doctorat, Université de METZ.
- [48] Simulateur de chromatogrammes avec effet de solvant, Université de la Réunion.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC de l'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Bibliographie

- [49] SKOOG. WEST. HOLLER, Traduction et révision par BUESS-HERMAN Claude, DAUCHOT-WEYMERRS Josette et DUMONT Freddy, Chimie Analytique (SKOOG. WEST. HOLLER), 1997.
- [50] SGOOG Douglas .A.WEST Donald. M .HOLLER F. James, .CROUCH Stanely.R, 2015.Traduction et Révision Scientifique de C. Buess-Herman, J. Dauchot et T. Doneux, Chimie Analytique, 3^e édition.
- [51] SKOOGS Douglas. NIEMAN A. Timothy. HOLLER F. James, 2003. Principes d'analyses Instrumentales, De Boeck.
- [52] SNYDER Liloyd et al, 1997. Pratical HPLC Méthod développement, 2^e édition USA: John Wiley and sons.
- [53] Théorie de la chromatographie, cour de chromatographie (Master 2 chimie), Orsay.
- [54] TWESTT, 1910. Chlorophylls in the plant and animal.
- [55] Umber. J, Chromatographie Liquide Haute performance, Nancy-Metz.
- [56] Ultraviolet-Visible Référence Spectra.
- [57] USP 40, Chromatography, Physical test Chapitre"621".
- [58] Vanthuyne 2010, La chromatographie sur support chiraux, Montpellier.
- [59] VERGE, 2012. Chromatographie Liquide Haute performance, Paris.
- [60] Vial J, 2006. Définition la validation de Méthode et outils associés Laboratoire environnement et Chimie analytique d'ESPCT.

Optimisation de la méthode de dosage par HPLC de l'Amiodarone dans les comprimés dosés à 200 mg

Bibliographie

Webographie

- [61] <https://.apps.who.int>>.15/04/2019.
- [62] <https://www.austinpublishinggroup.com/chromaography>.13/01/2019.
- [63] <https://www.chimie-briere.com>.15/02/2019.
- [64] <https://www.chromacademy.com/chromatography-HPLC/colonne-demensions/html>.25/02/2019
- [65] <https://www.elearning.univ-bejaia.dz>.30/01/2019.
- [66] <https://www.fda.gov>.06/01/2019.
- [67] <https://hmc.usp.org>.05/01/2019.
- [68] <https://www.ich.org>.23/03/2019.
- [69] <https://www.inarp.rnrt.tn>.03/04/2019.
- [70] <https://www.interchim.fr>.26/01/2019.
- [71] <https://intranet.intra.fr>.17/02/2019.
- [72] <https://www.itwreagents.com>.03/02/2019.
- [73] <https://www.jpds.nihs.go.jp>.25/12/2018
- [74] <https://www.lachimie.fr/analytique>.06/01/2019
- [75] <http://www.lncpp.dz/?service=medical-counseling>.16/02/2019.
- [76] <https://www.quinica.udea.edu.ca>.27/01/2019.
- [77] <http://www.sante.dz/lnc/missions.htm>.06/02/2019.

TERRAI Chahra chahraterrai1994@gmail.com	AMRANI Soumia samupharma21@gmail.com	ZEKKARI Nesrine nesrinephrm125@gmail.com
--	--	--

Résumé

Le Chlorhydrate d'Amiodarone est un anti-arythmique de classe III, disponible sous forme de comprimés dosés à 200mg, il possède des propriétés pharmaceutiques et pharmacologiques qui lui justifient son efficacité. Ce produit fini est dosé par l'HPLC lors de son control qualité au niveau du LNCPP. Le chromatogramme obtenu présente une trainé de pic exprimée par un facteur d'asymétrie supérieur à la norme USP ($A_s < 2$) qui est un paramètre important pour vérifier la conformité du système utilisé. Afin d'améliorer la séparation de la molécule par cette méthode, une gamme de modification est apportée sur les divers paramètres de l'HPLC. Ces essais se sont révélés concluants et propose une solution exploitable permettant de satisfaire aux exigences réglementaires en vigueur. Après l'étape d'optimisation, il est recommandé de revalider la méthode et cela dans le cas où les variations effectuées sont loin de la norme décrite dans les pharmacopées européenne et américaine. Néanmoins, si la limite de variation des conditions chromatographiques est respectée, la méthode est dite ajustée et reste validée et exonéré de la revalidation analytique.

Mots clés : *HPLC , Optimisation, facteur d'asymetrie, chlorhydrate d'amiodarone*

Abstract

Amiodarone Hydrochloride is a Class III anti-arrhythmic drug, available as 200mg tablets, with pharmaceutical and pharmacological properties that justify its efficiency. This finished product is dosed by HPLC during quality control at the National Pharmaceutical Quality Control Laboratory. The resulting chromatogram shows a peak train expressed by an asymmetry factor above the USP standard ($A_s < 2$), which is an important parameter for verifying the conformity of the system used. In order to improve the HPLC separation of the molecule, a range of modifications is made to its diver parameters. These tests have been shown to be successful and providing a workable solution to meet current regulatory requirements. After the optimization stage, it is recommended that the method be revalidated, in case the variations made are far from the Standard described in the European and American pharmacopoeias. Nevertheless, if the limit of variation is respected in the chromatographic conditions, the method is said to be adjusted and remains validated and exempt from analytical revalidation.

Key words : *HPLC , optimization , asymmetry factor, Amiodarone Hydrochloride.*