

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA I



Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie  
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de Fin D'études

En vue l'obtention du diplôme de Master II

*Option : Génie Biologique*

*Thème :*

**Contrôle de Qualité physico-chimique,  
microbiologique et toxicologique de l'Acide  
Folique (comprimé zanitra ® 5mg)**

*Soutenu le 15/12/2014 à : 13h*

**Présenté par :**

➤ BOULAHLIB Nabil

**Devant les membres du jury :**

➤ Mr OUSSADOU L.	MAA	UBI	Président
➤ M <sup>me</sup> EL MAHDI I.	MAA	UBI	Examinatrice
➤ M <sup>me</sup> DEFFAIRI D.	MAA	UBI	Promotrice
➤ M <sup>elle</sup> LATRECHE F.	Analyste	SAIDAL	Co-promotrice

**Promotion : 2013/2014**

## **Remerciements**

*En premier lieu, je remercie **Dieu** le tout puissant, le Miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de m'avoir permis de finaliser ce travail dans de meilleures conditions.*

*En second lieu, je tiens à remercier vivement ma promotrice **Mme DEFFAIRI D.**, Maître assistante A au département agroalimentaire université Blida 1, pour l'honneur qu'elle m'a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.*

*Je remercie particulièrement notre co-promotrice **Melle LATRECHE F.**, analyste au niveau de laboratoire de contrôle de qualité de l'unité Biotic de SAIDAL, pour m'avoir guidé tout au long de la réalisation de ce travail, et pour sa gentillesse*

*Je tiens également à présenter mes plus vifs remerciements à **Mr OUSSADOU L.**, Maître assistant A au département de Biologie et physiologie cellulaire université Blida 1, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury.*

*Je remercie **Mme EL MAHDI I.**, Maître assistante A, département de Biologie et physiologie cellulaire université Blida 1, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie le Chef de Service du laboratoire de physicochimie, **Mr NOUES Salim**, et tout le personnel de l'unité Biotic pour m'avoir accueilli et facilité grandement notre stage au sein de son laboratoire.*

*Je remercie tous les enseignants ainsi que tout le personnel du  
Département de biologie.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail ....*

*A mon père et à ma mère*

*Une réserve inépuisable de courage vous a permis d'accomplir votre devoir  
tous les jours et de vous fier au bon DIEU pour le lendemain.  
C'est que vous avez toujours compris que toute réussite déguise  
une abdication. Puisse ce travail récompenser votre patience et  
persévérance et tous les sacrifices que vous avez consentis  
au nom de la famille*

*A mes frères et à toute ma famille,*

*Demain ne sera pas comme hier, il sera nouveau et il dépendra de nous.  
Notre avenir comme notre passé doit être solidaire. C'est la plus  
belle chose qui nous est donnée naturellement. Notre force  
résidera toujours dans notre sincère entente  
et notre esprit de fraternité.*

*A tous mes amis,*

*Pour notre amitié et tous les bons moments passés et à venir,  
Pour votre présence, vos bons conseils et nos fous rires partagés  
Un très grand merci à tous et à toutes.*

*A tous ceux qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce travail, merci à tous*

*A Mes enseignants .....du primaire à .....l'Université ; Merci*

*Nabil*



## Glossaire

**Bactéries Mésophiles :** Sont des bactéries qui croissent à des températures comprises entre 20 et 40 °C.

**Collyre :** Est une substance médicamenteuse sous la forme de goutte à appliquer dans l'œil, au niveau de la conjonctive, la zone blanche de l'œil.

**Diluant :** C'est un excipient utilisé dans la formulation d'un comprimé ou d'une gélule, notamment pour l'industrie pharmaceutique, il sert à obtenir un volume de poudre suffisant pour fabriquer un comprimé de la taille désirée.

**Entérocyte :** Cellule la plus répandue de la muqueuse de l'intestin grêle, caractérisé par un renouvellement cellulaire rapide (durée de vie de 3 à 4 jours).

**Érythropoïèse :** Désigne l'ensemble des mécanismes cellulaires permettant de produire les érythrocytes (ou globules rouges) dans la moelle osseuse à partir de cellules souches indifférenciées.

**Furoncles :** Le furoncle est un gros bouton très douloureux, d'abord rouge et dur, qui se transforme rapidement en pustule (bouton à tête blanche contenant du pus) due à une infection bactérienne.

**Homéopathie :** Méthode thérapeutique selon lequel un patient devrait être traité au moyen d'une substance produisant expérimentalement chez une personne saine des symptômes semblables à ceux présentés par la personne affectée, Les substances choisies selon cette méthode peuvent être administrées à doses non toxiques.

**Liant :** C'est un produit qui sert à agglomérer en masse solide, des particules solides sous forme de poudre et permet la cohésion entre elles.

**Lubrifiant :** Excipient dont le rôle est essentiellement destiné à faciliter la compression des comprimés.

**Méthotrexate :** Médicament utilisée dans le traitement de certains cancers et maladies auto-immunes, antagoniste de l'acide folique.

**Pharmacopée :** Est un ouvrage réglementaire destiné aux professionnels de santé qui définit les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments ainsi les méthodes d'analyses à utiliser pour en assurer leur contrôle.

**Sinusite :** Désigne l'inflammation des muqueuses qui recouvrent l'intérieur des sinus (cavités osseuses situées dans les os du visage).

## RESUME

Notre travail effectué au laboratoire de contrôle de qualité de l'unité SAIDAL Biotic (Gué de Constantine), a porté sur le contrôle de la qualité physico-chimique, microbiologique et toxicologique de l'acide folique « comprimé ZANITRA ® 5mg », ce contrôle a pour rôle de vérifier la bonne qualité du produit, et il comprend:

Un contrôle de la qualité physico-chimique des matières premières et du produit fini, mettant en évidence les différents paramètres indispensables comme les tests d'identifications par des moyens chimiques et chromatographiques, ainsi les épreuves physiques tels que l'étude de la friabilité et le délitement des comprimés.

Un contrôle microbiologique du produit fini, qui a porté sur la détection et le dénombrement des proliférations microbiennes et les germes pathogènes qui pouvant altérer la qualité du médicament.

Un contrôle toxicologique du produit fini qui a porté sur la recherche ou la révélation d'une éventuelle toxicité chez les souris albinos pour confirmer l'innocuité du produit avant la commercialisation.

L'ensemble des résultats de cette étude est parfaitement conforme aux normes internationales décrites par la Pharmacopée Européenne 2008, et se traduisent par la bonne qualité du produit de point de vue :

- Physico-chimique, par la bonne qualité des matières premières et de produit fini.
- Microbiologique, par l'absence des micro-organismes pathogènes.
- Toxicologique, par l'absence des anomalies dans ce médicament.

Mots clés : acide folique, contrôle physico-chimique, contrôle microbiologique, contrôle toxicologique, ZANITRA® 5mg.

## ABSTRACT

Our work in the laboratory quality control of SAIDAL Biotic unit (Gue de Constantine), focused on the quality control of physico-chemical, microbiological and toxicological of the folic acid « tablet ZANITRA® 5mg », that control its role is to verify the good quality of the product, and it includes:

The physico-chemical quality control of raw materials and the finished product, highlighting the various essential parameters such as tests of identifications by chemicals and chromatographic means, and physicals tests such as the study of the friability and disintegration of the tablets.

The microbiological control of the finished product, which focused on the detection and enumeration of microbial growth and pathogenic germs that can affect the quality of the drug.

The toxicological control of the finished product that focused on the research or the revelation of a possible toxicity in albino mice to confirm the product's safety before the marketing.

The overall results of this study is perfectly in accordance with international standards described in the European Pharmacopoeia 2008, and result in the good product quality from the perspective:

- Physico-chemical, by the good quality of raw materials and finished product.
- Microbiological, by the absence of pathogenic micro-organisms.
- Toxicological, by the absence of abnormalities in the drug.

Keywords: folic acid, physico-chemical control, microbiological control, toxicological control, ZANITRA® 5mg.

## ملخص

إن عملنا الذي تم في مخبر مراقبة النوعية لوحدة صيدال بيوتيك (جسر قسنطينة), ركز على مراقبة النوعية الفيزيوكيميائية, الميكروبيولوجية و السمية لحمض الفوليك « قرص زانيترا 5مغ », هذه المراقبة تهدف للتحقق من النوعية الجيدة للمنتوج, و تتضمن:

مراقبة النوعية الفيزيوكيميائية للمواد الأولية والمنتوج النهائي, وتسليط الضوء على مختلف المعايير الأساسية مثل اختبارات تحديد الهوية بوسائل كيميائية وكروماتوغرافية, وأيضا الإختبارات الفيزيائية مثل دراسة تفتت و تفكك الأقراص.

المراقبة الميكروبيولوجية للمنتوج النهائي, والتي تمثلت في كشف وتعداد نمو الميكروبات و الجراثيم الخطيرة التي يمكن أن تؤثر على نوعية الدواء.

المراقبة السمية للمنتوج النهائي والتي ارتكزت على البحث أو الكشف عن سمية محتملة لدى الفئران البيضاء وهذا لتأكيد سلامة المنتوج قبل التسويق.

النتائج الإجمالية لهذه الدراسة متطابقة تماما مع المعايير الدولية الموضوعة في دستور الأدوية الأوروبي عام 2008، وترجم بالجودة الجيدة للمنتوج من وجهة النظر:

- الفيزيوكيميائية, من خلال النوعية جيدة للمواد الأولية والمنتوج النهائي.
- الميكروبيولوجية, من خلال عدم وجود الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض.
- السمية, من خلال غياب الإختلالات في هذا الدواء.

كلمات مفتاحية: حمض الفوليك, مراقبة فيزيوكيميائية, مراقبة ميكروبيولوجية, مراقبة سمية, زانيترا 5مغ.

# SOMMAIRE

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction.....	1
<b>I. Généralités sur les médicaments</b>	
1. Définition d'un médicament.....	2
2. Mise en forme du médicament.....	2
3. Dénomination des médicaments.....	3
4. Conditionnement des médicaments.....	3
5. Sources des médicaments.....	4
6. Voies d'administration du médicament.....	4
7. Comprimés.....	7
8. Antianémiques.....	7
<b>II. Zanitra</b>	
1. Acide folique (principe actif).....	8
1.1- Définition.....	8
1.2- Sources alimentaires.....	9
1.3- Apports nutritionnels conseillés.....	9
1.4- Pharmacocinétique.....	10
1.5- Pharmacodynamie.....	12
2. Description de Zanitra® 5mg.....	12
<b>III. Contrôle de qualité</b>	
1. Définition de qualité.....	14
2. Contrôle de qualité.....	14
3. Assurance de qualité.....	14
4. Niveaux de contrôle.....	15

## **PARTIE PRATIQUE**

<b>I. Matériel et Méthodes</b> .....	16
1. Matériel d'étude .....	16
2. Méthodes.....	16
2.1-Echantillonnages.....	16
2.2- Contrôle physico-chimique des matières premières et du produit fini.....	17
2.3- Contrôle microbiologique du produit fini.....	26
2.4- Contrôle toxicologique.....	34
<b>II. Résultats et Discussion</b>	
1. Résultats du contrôle physico-chimique des matières premières et du produit fini .....	35
2. Résultats de contrôle microbiologique du produit fini.....	44
3. Résultats de contrôle toxicologique du produit fini.....	46
Conclusion.....	47
Références Bibliographiques	
Annexes	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Formes galéniques destinées à la voie transmuqueuse.....	6
<b>Tableau II :</b> Avantages et inconvénients des comprimés .....	7
<b>Tableau III:</b> Composition de Zanitra® 5mg.....	13
<b>Tableau IV :</b> Résultats de l'analyse physicochimique de l'Acide folique.....	35
<b>Tableau V:</b> Résultats de l'analyse physicochimique de l'Amidon de Maïs.....	40
<b>Tableau VI :</b> Résultats de contrôle physicochimique du produit fini.....	42
<b>Tableau VII :</b> Résultats de contrôle microbiologique du produit fini.....	44
<b>Tableau VIII :</b> Résultats de contrôle toxicologique de produit fini zanitra® 5mg.....	46

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Eléments indicatifs d'une boîte de médicaments.....	3
<b>Figure 2 :</b> Différentes voies d'administration parentérale.....	5
<b>Figure 3 :</b> Constitution de l'acide folique.....	8
<b>Figure 4:</b> Photographie représente l'acide folique.....	9
<b>Figure 5:</b> Absorption et distribution des monoglutamates.....	11
<b>Figure 6:</b> Rôle des folates chez la femme enceinte.....	12
<b>Figure 7:</b> Dénombrement des bactéries viables totales et des levures et moisissures.....	29
<b>Figure 8:</b> Différentes étapes de la recherche et d'identification des entérobactéries.....	31
<b>Figure 9:</b> Chromatogramme de témoin.....	37
<b>Figure 10:</b> Chromatogramme de l'essai.....	37
<b>Figure 11 :</b> Photographie représente le résultat de la chromatographie sur couche mince.....	39

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.

**AF** : Acide Folique.

**B P C** : Bonnes Pratiques Cliniques.

**B P F** : Bonnes Pratiques de Fabrication.

**BPLS** : Gélose vert Brillant-rouge de Phénol-Lactose-Saccharose.

**BVT** : Bactéries Viables Totales.

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince.

**CP** : Comprimé.

**CQ** : Contrôle de Qualité.

**CS** : Cendres Sulfuriques.

**D C I** : Dénomination Commune Internationale.

**Géloses CASO** : Gélose de Caséine de Soja.

**GR** : Globules Rouges.

**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance.

**PE** : Pharmacopée Européenne.

**PteGlu1** : Ptéroyl monoglutamate.

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*.

**SCR** : Substance Chimique de Référence.

**TBG** : Tétrathionate-Bile-vert-brillant.

**Te** : Teneur en Eau.

**UFC** : Unité Formant colonie.

**UV** : Ultra Violet.

**VRBG** : Gélose glucosée Biliée au cristal Violet et au Rouge neutre.

**XLD** : Xylose-lysine- Désoxycholate.

# *Introduction*

## INTRODUCTION

Un médicament est une substance possédant des propriétés curatives ou préventives destinées à guérir, soulager ou prévenir les maladies (**Vandamme et al., 2010**).

L'industrie pharmaceutique selon **Goetz-Lopes (2007)**, se doit de réaliser leur production dans des conditions assurant leur sécurité et leur qualité, et de les diffuser partout où ils peuvent contribuer à la santé des populations.

L'histoire du médicament pharmaceutique industriel remonte au milieu du 19<sup>e</sup> siècle où des médicaments issus de la chimie organique commencent à être industrialisés en Europe. Les premiers médicaments à être industrialisés sont issus de l'extraction de principes actifs contenus dans des plantes (**Baxerres, 2013**).

Selon **Landry (2013)**, le XX<sup>e</sup> siècle voit l'explosion de l'industrie pharmaceutique, avec la mise sur le marché de très nombreuses molécules de synthèse, puis de substances biologiques fabriquées par les techniques de biotechnologie.

Mais avant toute mise sur le marché et d'après **Vaubourdolle (2007)**, dans les procédures générales de fabrication, des contrôles sont préconisés. Il s'agit, en fait, de tests, vérifications, mesures qui sont réalisés en cours de fabrication, afin de s'assurer que le produit répondra aux spécifications.

Ces contrôles sont appliqués à des matières diversifiées tel que : les matières premières entrant dans la composition du produit, le produit en cours de fabrication, produit fini...etc. Ces analyses doivent être justifiées ou conformées aux normes qui sont décrites dans les pharmacopées.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressées de réaliser ce travail de fin d'étude qui est effectué au laboratoire de contrôle de la qualité à l'unité SAIDAL Biotic (Gué de Constantine), sur un médicament non obligatoirement stérile « ZANITRA ® 5mg » sous forme comprimé (DCI : Acide Folique), dont l'objectif est:

- De procéder au contrôle physicochimique de la matière première et du produit fini.
- De contrôler la qualité microbiologique et toxicologique du produit fini, afin de déterminer la bonne qualité de ce médicament par rapport aux exigences décrites par la Pharmacopée Européenne 2008.

*Partie*  
*Bibliographique*

## **I. Généralités sur les médicaments**

### **1. Définition d'un médicament**

#### **1.1 -Juridique**

On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique (**Aiache et al ., 2008**).

#### **1.2 -Pharmacologique**

Un médicament est constitué d'un principe actif et de « substances inertes » adaptées à la voie d'administration à laquelle il est destiné, appelées excipients. La substance active est présente à une concentration donnée appelée dosage. Il possède des propriétés pharmacologiques qu'il exerce sur une cible organique ou fonctionnelle d'où résulteront les indications thérapeutiques (**Stora, 2010**).

## **2. Mise en forme du médicament**

### **2.1-Principe actif (substance active)**

Tout composant d'un médicament qui est destiné à exercer une action pharmacologique ou un autre effet direct en rapport avec le diagnostic, le traitement ou la prévention d'une maladie, ou à agir sur la structure ou les fonctions de l'organisme humain ou animal par des moyens pharmacologiques. Un médicament peut contenir plusieurs principes actifs. Terme équivalent : substance active (**Aiache et al ., 2008**).

### **2.2- Excipient**

Tout composant, autre que le(s) principe(s) actif(s), qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication. La fonction d'un excipient est de servir de vecteur (véhicule ou base) au (x) principe(s) actif(s), ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du produit telles que la stabilité, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication. La formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients (**Aiache et al ., 2008**).

### 3. Dénomination des médicaments

Chaque médicament est défini par le nom chimique de son principe actif, la dénomination commune internationale (D.C.I) et un ou plusieurs noms de marque également appelés noms de fantaisie (**Dessaigne, 2004**), (Voir figure 1).

Le nom chimique est la traduction littérale de la molécule chimique du médicament. Il n'est pas utilisé en pratique courante. La dénomination commune internationale (DCI) est le nom simplifié de la molécule chimique. Elle est attribuée par l'Organisation mondiale de la santé (**Aveline et al., 2000**). Le nom de « spécialité » ou « nom de marque » est attribué à une molécule par le laboratoire qui le commercialise. Une même molécule active est souvent commercialisée par plusieurs laboratoires sous de nombreux noms de spécialités différentes. Le signe « ® » qui accompagne les noms de spécialité signifie « registered » en anglais, c'est à dire propriété commerciale (**Aveline et al., 2000**).

Exemple :



**Figure 1** : Eléments indicatifs d'une boîte de médicaments (**Aveline et al., 2000**).

### 4. Conditionnement des médicaments

D'après **Mathieu et Fonteneau (2008)** :

- Le conditionnement unitaire est toujours privilégié pour éviter après ouverture l'altération du principe actif.
- Pour les médicaments sensibles à la lumière, les flacons teintés ou les blisters opaques sont utilisés.
- Pour les semi-solides, les tubes en aluminium sont employés.

-Inscrire sur les emballages les recommandations concernant les conditions de conservation.

Exemple : produits à conserver au réfrigérateur avant ou après ouverture.

## **5. Sources des médicaments**

### **5.1-Médicaments d'origine microbiologique**

Certains micro-organismes cultivés de façon appropriée sécrètent diverses substances utilisées en thérapeutique. Il s'agit essentiellement des antibiotiques, découverte fondamentale dans le traitement des maladies infectieuses (**Talbert et al ., 2009**).

### **5.2-Médicaments d'origine minérale**

De nombreux minéraux ont été, comme les plantes, longtemps utilisés avant le développement de la chimie organique.

Exemples: eau, talc, argiles, bicarbonate de sodium, sulfate de magnésium, chlorure de sodium, chlorure de calcium... (**Talbert et al ., 2009**).

### **5.3- Médicaments d'origine synthétique**

La chimie organique (chimie des composés du carbone) représente de loin la principale source de production des médicaments modernes. La synthèse de molécules complexes nécessite souvent d'importantes études de recherche et de mise au point par étapes successives pour aboutir à la structure désirée (**Talbert et al ., 2009**).

### **5.4- Médicaments d'origine biotechnologique**

Il s'agit de méthodes de synthèse très élaborées faisant intervenir pour l'essentiel des techniques de génie génétique. Le but est d'isoler des cellules vivantes (microorganismes) et de leur faire produire des produits d'intérêt thérapeutique qu'elles ne synthétiseraient pas en temps normal. Exemple : interféron, insuline humaine (**Talbert et al ., 2009**).

## **6. Voies d'administration du médicament**

### **6.1- Définition**

C'est le chemin qu'emprunte le médicament pour pénétrer dans l'organisme vers la circulation sanguine ou pour agir localement (**Stora, 2008**).

## 6.2-Voie parentérale (ou injectable)

Elle correspond au passage du médicament à travers la peau, directement vers la circulation générale, à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (Stora, 2008), (figure 2).

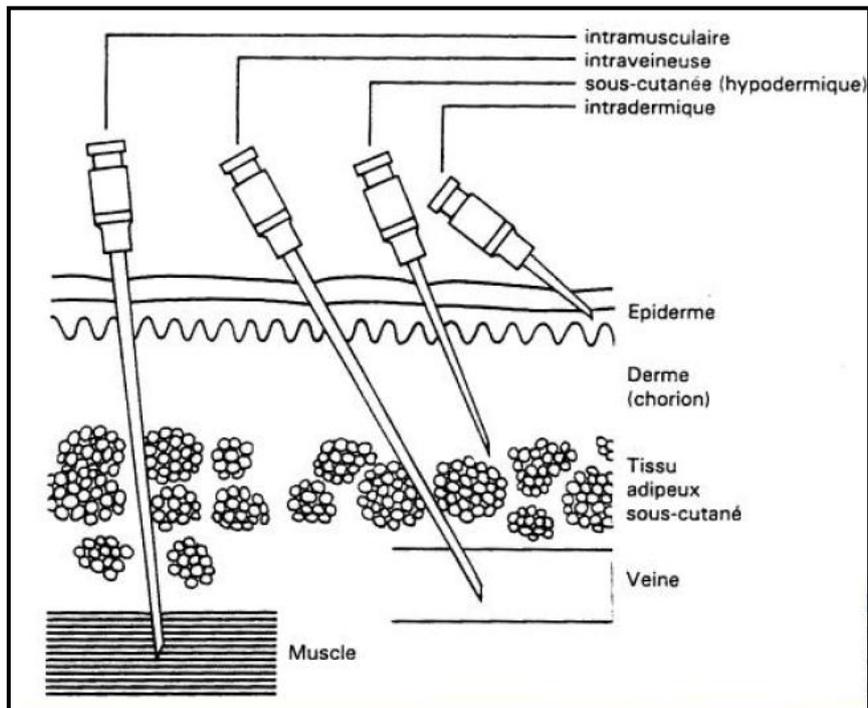


Figure 2 : Différentes voies d'administration parentérale (Aiache et al., 2008).

## 6.3-Voie transmuqueuse

Les différentes voies d'administration se présentent dans le tableau I.

Tableau I : Formes galéniques destinées à la voie transmuqueuse

Voie d'administration	Présentation
<b>Sublinguale</b>	comprimé (glossette) granule (homéopathie en particulier) solution
<b>Rectale</b>	capsule rectale (suppositoire à enveloppe), lavement, mini-lavement, mousse rectale, pommade rectale, solution à usage rectal, suppositoire
<b>Vaginale</b>	capsule vaginale, comprimé vaginal (ovule sec) crème et gelée vaginales, ovule
<b>Aériennes supérieures et ORL</b>	bain de bouche collutoire gargarisme gouttes auriculaires gouttes nasales pommade nasale
<b>Oculaire</b>	capsule ophtalmique collyre (gouttes ophtalmiques) insert ophtalmique occlusif ophtalmique pommade ophtalmique solution pour bain oculaire (lotion oculaire)
<b>Pulmonaire</b>	préparation pour aérosol

(Talbert *et al.*, 2009)

#### 6.4- Voie orale

C'est la voie la plus couramment utilisés. Le médicament est pris par la bouche, emprunte la voie digestive, traverse la barrière intestinale pour passer dans le sang (Stora, 2008).

## 7. Comprimés

### 7.1-Définition

Les comprimés sont définis à la Pharmacopée française comme étant « des préparations de consistance solide contenant chacun une unité de prise d'une ou de plusieurs substances actives et obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules » (Vaubourdolle, 2007).

### 7.2- Avantages et inconvénients des comprimés

Les Avantages et inconvénients des comprimés se présentent dans le tableau II.

**Tableau II** : Avantages et inconvénients des comprimés

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Emploi facile : solidité suffisante pour le transport et le conditionnement, faciles à avaler.</li> <li>• Dosage précis.</li> <li>• Forme sèche : bonne conservation.</li> <li>•Possibilité de masquer complètement la saveur par l'enrobage.</li> <li>• Possibilité de contrôler la libération du principe actif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Si le délitement n'est pas rapidement assuré, il y a un risque pour la muqueuse digestive.</li> <li>• Pas de principe actif liquide.</li> <li>• Nécessité d'utiliser de nombreux excipients qui peuvent présenter des effets secondaires.</li> </ul>

(Allo *et al.* ,2005)

## 8. Antianémiques

Les antianémiques sont des médicaments qui stimulent la production des globules rouges (activation de l'érythropoïèse).Ils améliorent la captation et le transport de l'oxygène par l'hémoglobine des globules rouges (Stora, 2010).

Ils favorisent la synthèse de l'hémoglobine par un apport en fer, vitamine B12, acide folique, car la carence de chacun de ces éléments joue un rôle important dans l'anémie (Stora, 2010). D'autre part l'anémie se définit selon Marolla *et al.* (2008), qu'il s'agit d'une baisse du taux d'hémoglobine dans le sang et non pas d'une baisse du nombre de globules rouges (GR).

Un sang peut avoir un nombre réduit de GR mais être très riche en hémoglobine qui assurera les besoins en transport d'oxygène (Marolla et al., 2008).

Par exemple :

**Anémie mégaloblastique**

Il s'agit d'une baisse d'hémoglobine mais ici le volume globulaire est augmenté (Aveline et al., 2000). Selon Mehta et Hoffbrand (2003), il existe une anomalie de la synthèse de l'ADN, habituellement provoquée par une carence en vitamine B12 ou en acide folique. Le traitement consiste à administrer 5 mg d'acide folique par jour pendant 4 mois, puis à décider s'il y a lieu de poursuivre l'administration d'acide folique.

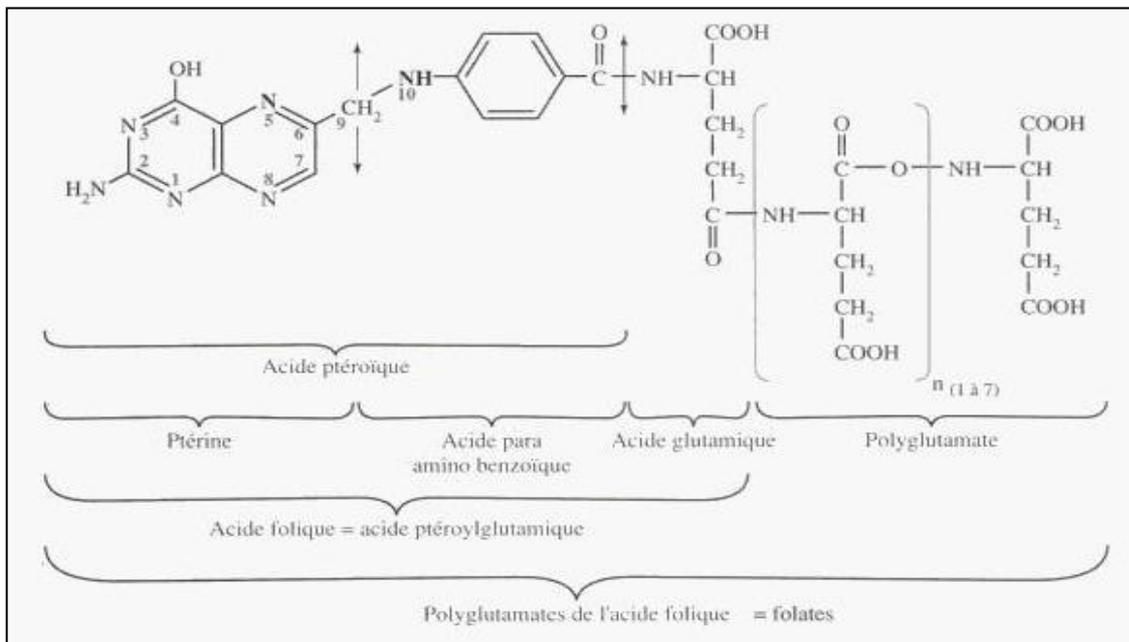
Exemple : le traitement par les comprimés Zanitra ® 5mg.

**II. Zanitra**

**1. Acide folique (principe actif)**

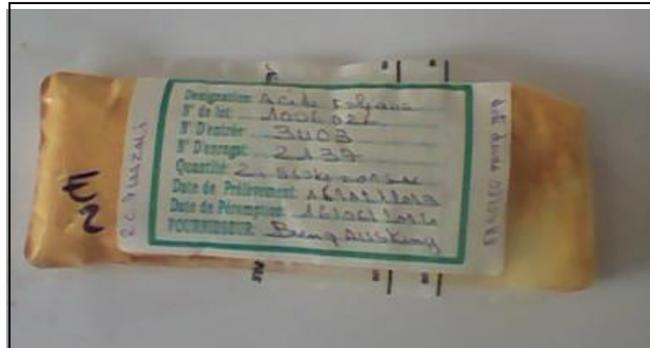
**1.1-Définition**

L'acide folique est composé d'une molécule d'acide ptéroïque reliée à une molécule d'acide glutamique. L'acide ptéroïque est constitué d'un cycle ptérine et d'un cycle d'acide para-amino-benzoïques (figure 3) (Frénot et Vierling, 2001).



**Figure 3 : Constitution de l'acide folique (Frénot et Vierling, 2001).**

L'acide folique se présente sous forme d'une poudre jaune orangé. Il est soluble dans les acides et les bases diluées, peu soluble dans l'eau, insoluble dans l'éthanol, l'acétone, l'éther, le chloroforme (Frénot et Vierling, 2001)( figure 4).



**Figure 4:** Photographie représente l'acide folique (Original).

### 1.2-Sources alimentaires

Les aliments les plus riches sont :

Les légumes à feuilles vert foncé, le foie et les rognons (Latham, 2001).

Fruits frais, légumineuses, levure, céréales (Chegrani-Conan, 2010).

Selon Lévy-Dutel et Scotto (2011), L'apport en acide folique (vitamine B9) ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) :

- Plus de 200 : levure, foie.
- 100 à 200 : salade verte, mâche, maïs, châtaigne, noix, avocat, amande.
- 50 à 100 : légumes verts, haricot vert, melon, pois chiche, lentille, œuf, fromage fermenté.

### 1.3-Appports nutritionnels conseillés

Les besoins sont de l'ordre de 350-400  $\mu\text{g}$  par jour chez l'adulte et de 800  $\mu\text{g}$  par jour chez la femme enceinte (Darmon et Darmon, 2008).

Chez les femmes ayant déjà eu des enfants porteurs d'anomalies de la fermeture du tube neural (spina bifida ...), certains auteurs ont constaté qu'une supplémentation folique périconceptionnelle de 5 mg par jour dans le mois qui précède et les 3 mois qui suivent la conception diminuait la récurrence du risque malformatif pour les grossesses ultérieures (Dictionnaire SAIDAL, 2005).

#### **1.4- Pharmacocinétique**

La pharmacocinétique est l'étude du devenir des médicaments dans l'organisme (**Léonard et Ben Amar, 2002**). Selon **Claverie et Hedde (2008)**, elle comprend quatre étapes :

- ✓ L'absorption
- ✓ Distribution
- ✓ Métabolisme
- ✓ Elimination

##### **1.4.1-Absorption**

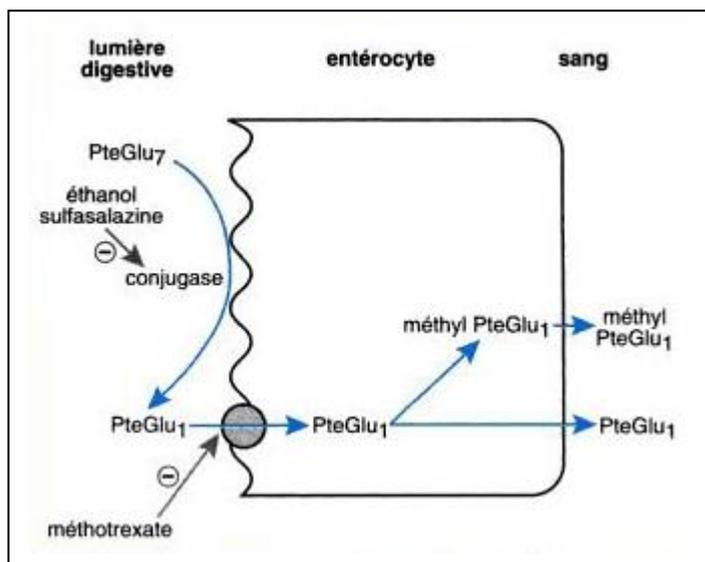
La molécule d'acide folique est l'acide ptéroylglutamique. Dans la nature, la plus grande partie se trouve sous forme de polyglutamates (1 à 7 résidus glutamates reliés en chaîne à un résidu glutamyle constitutif) (**Cano et al ., 2007**).

Ces polyglutamates sont la forme prédominante des folates alimentaires qui doivent être déconjugués par une enzyme spécifique dans la lumière intestinale avant d'être absorbés (**Leverve et al ., 2001**).

Donc on peut dire selon **Ferland (2003)**, que l'acide folique est absorbé sous forme de ptéroyl monoglutamate dans la partie proximale de l'intestin par transport actif ou par diffusion passive.

##### **1.4.2- Distribution**

La forme ptéroyl monoglutamate (PteGlu1) selon **Guénard (2001)**, est rejeté dans le sang portal soit directement, ou selon **Beaudeau et Durand (2008)**, les monoglutamates sont ensuite transformés en 5méthyl-tétrahydrofolates, qui passent ensuite dans le sang portal (figure 5).

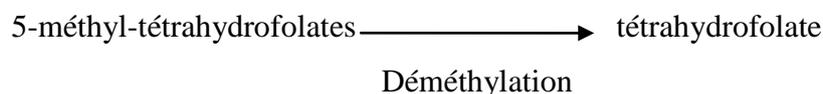


**Figure 5:** Absorption et distribution des monoglutamates (Guénard, 2001).

Les folates sont distribués dans tous les tissus et milieux de l'organisme et stockés principalement dans le foie (Cano et al., 2007).

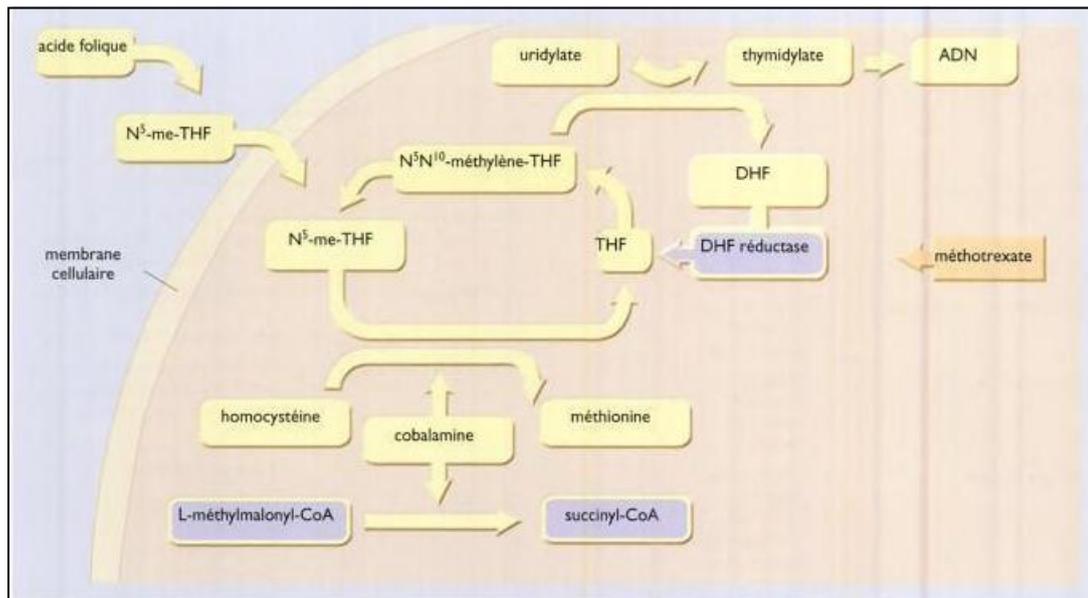
### 1.4.3- Métabolisme

Transporté sous forme méthylée, l'acide folique doit être déméthylé en présence de vitamine B12 pour entrer dans la cellule (Leverve et al., 2001).



Le tétrahydrofolate est un transporteur d'entités monocarbonées qui sont indispensables dans de nombreuses biosynthèses (Patrick, 2002). Parmi lesquelles :

La synthèse de certains acides aminés (méthionine), ainsi que du thymidylate et des acides nucléiques indispensables à la synthèse de l'ADN, à sa réplication, et à sa réparation (Vidailhet et al., 2008) (figure 6).



**Figure 6:** Rôle des folates chez la femme enceinte (Page et al., 1999).

#### 1.4.4-Elimination

Elle est urinaire et fécale (Dictionnaire SAIDAL, 2005).

#### 1.5- Pharmacodynamie

L'acide folique est une vitamine du groupe B. Les métabolites actifs servent de coenzymes à de nombreuses réactions enzymatiques intervenant dans la synthèse des purines, le métabolisme des acides aminés (Dictionnaire SAIDAL, 2005).

### 2. Description de Zanitra® 5mg

Ce médicament se présente sous forme de comprimés lisses, bombés, de couleur jaune, conditionnés dans des boîtes de 60. Sa Dénomination Commerciale Internationale est : l'acide folique.

#### 2.1-Classe pharmaco-thérapeutique

Vitamine antianémique (Dictionnaire SAIDAL, 2005).

#### 2.2- Composition

Les compositions de comprimé Zanitra® 5mg se présentent dans le tableau III.

**Tableau III** : Composition de Zanitra ® 5mg

composition	Fonction (s)
Acide folique	Principe actif
phosphate bicalcique	Diluant, utilisé pour le remplissage des gélules et surtout pour la fabrication des comprimés
amidon de maïs	Liant, diluant.
stéarate de magnésium	Lubrifiant. Améliore la compression

### 2.3-indications

D'après **Dictionnaire SAIDAL en 2005**, les indications sont :

- ✓ Anémies macrocytaires par carence en acide folique.
- ✓ Troubles chroniques de l'absorption intestinale quelle que soit leur origine.
- ✓ Carences d'apport : malnutrition, éthylysme.

### 2.4- Contre-indications

Allergie à l'un des constituants (**Dictionnaire SAIDAL, 2005**).

### 2.5-Posologie et mode d'administration

Les posologies journalières sont comprises entre 5 et 15 mg, soit 1 à 3 comprimé(s) par jour (**Dictionnaire SAIDAL, 2005**).

### 2.6- Effets indésirable

Très rares cas de réactions allergiques cutanées (**Dictionnaire SAIDAL, 2005**).

### 2.7- Surdosage

Un apport excessif d'acide folique est suivi d'une augmentation de l'élimination urinaire (**Dictionnaire SAIDAL, 2005**).

### 2.8-Conditions particulières de conservation

A l'abri de la lumière (**Dictionnaire SAIDAL, 2005**).

### **III. Contrôle de qualité**

#### **1. Définition de qualité**

La qualité est définie comme « L'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites» **(Raiffaud,2001)**.

La qualité était autrefois contrôlée, elle est aujourd'hui conçue et assurée en même temps que le produit lui-même **(Bonnefoy et al ., 2002)**.

#### **2. Contrôle de qualité**

Ensemble des contrôles effectués tout le long de la chaîne de fabrication d'un médicament. Il est sous la responsabilité du pharmacien responsable du laboratoire fabricant **(Pebret, 2005)**. Les objectifs du contrôle de la qualité (CQ) sont de veiller à ce que les propriétés des matières premières et des produits finaux répondent en tout temps à des normes préalablement définies **(Hulse, 2008)**.

Le contrôle de qualité est une des étapes de l'assurance de qualité **(Gentilini et al .,2012)**.

#### **3. Assurance de qualité**

Elle représente l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les préparations sont de la qualité requise pour l'usage auquel elles sont destinées. Elle est obtenue par la mise en œuvre d'un ensemble approprié de dispositions préétablies et systématiques, destinées à donner confiance en l'obtention de la qualité requise **(Fonteneau et Klusiewicz, 2008)**. Elle regroupe :

##### **3.1- Bonnes Pratiques de Fabrication (B.P.F.)**

Elles se présentent sous la forme d'un guide comprenant neuf chapitres indiquant les différents moyens à mettre en œuvre pour garantir la qualité des produits mis sur le marché **(Branger et al ., 2007a)**.

##### **3.2- Bonnes Pratiques Cliniques (B.P.C)**

B.P.C constituent un ensemble d'exigences de qualité dans les domaines éthique et scientifique, reconnus au plan international, qui doivent être respectées lors de la

planification, la mise en œuvre, l'enregistrement et notification des essais clinique (Altavilla ,2012).

#### **4. Niveaux de contrôle**

##### **4.1- Contrôle physico-chimiques**

Parmi les propriétés physico-chimiques, la connaissance de la solubilité dans l'eau, dans des milieux aux degrés d'acidité (pH) variés, qui miment les conditions retrouvées dans l'estomac et dans l'intestin, est essentielle. La résistance aux variations de température, d'humidité (Dessaigne, 2004).

##### **4.2- Contrôle microbiologique**

La recherche des micro-organismes dans tous les produits destinés à l'homme est obligatoire (Delarras, 2014). L'analyse des critères microbiologiques s'appuie sur des techniques de dénombrements, essentiellement des bactéries, les levures et moisissures. L'objectif est en fait de vérifier l'état sanitaire du produit avant la vente (Raiffaud, 2001).

##### **4.3- Contrôle toxicologique**

La toxicologie (des mots grecs toxikon signifiant poison et logos science) est l'étude des poisons, leurs identifications et leurs effets. Étant donné que tous les médicaments à une certaine dose peuvent être des poisons, la toxicologie réfère également à l'étude de la toxicité des médicaments (Léonard et Ben Amar, 2002).

*Matériel*  
*ET*  
*Méthodes*

Notre travail a été effectué au niveau de l'unité BIOTIC de SAIDAL (Gué de Constantine- ALGER) durant la période s'étalant de la fin du mois de mars à la fin du mois de juin 2014 soit une durée totale de 03 mois dont l'objectif :

Consiste à contrôler la conformité d'un comprimé non obligatoirement stérile **ZANITRA® 5mg** du point de vue physico-chimique, microbiologique et toxicologique.

## **I. Matériel et méthodes**

### **1. Matériel d'étude**

Les matières premières : Le principe actif (l'acide folique), et l'excipient (amidon de maïs).  
Le produit fini : Zanitra® 5mg.

5 souris albinos femelles de race Swiss ayant un poids entre 17-24g pour chaque souris, dont l'origine est l'élevage usine SAIDAL Gué de Constantine dans les conditions de température est de 24 °C, avec une alimentation constituée de granulés de provenance de production locale à Bouzareah et eau de ville.

Matériels non biologique

Appareils, réactifs et verrerie (voir l'annexe I, et annexe II).

### **2. Méthodes**

#### **2.1- Echantillonnages**

L'échantillonnage est une étape primordiale qui conditionne la représentativité des résultats.

##### **❖ Les matières premières**

Les zones de stockage des matières premières doivent être conçues et adaptées en vue d'assurer de bonnes conditions de stockage. En particulier, elles doivent être propres et sèches. Le prélèvement est effectué à l'aide d'une cuillère stérile à partir de sacs propres contenant 100 g de matière, et étiquetés avec la notion de la date, le nom de la matière ainsi que le numéro du lot et le nom du fournisseur.

##### **❖ Le produit fini**

Pour les contrôles physicochimique et toxicologique, le prélèvement du produit fini est réalisé dès la fin de la production (après conditionnement), les boîtes sont prises au hasard à partir du magasin de stockage.

Pour le contrôle microbiologique : Les comprimés conditionnés sont prélevés au début, au milieu, et à la fin de la production.

## **2.2- Contrôle physico-chimique des matières premières et du produit fini**

Le protocole suivi et les techniques appliquées pour le contrôle physico-chimique sont ceux recommandés par la **Pharmacopée Européenne (2008)**.

### **2.2.1- Matières premières**

#### **2.2.1.1- Principe actif**

##### **2.2.1.1.1- Caractères**

- a) Aspect : Cet essai consiste à une vérification visuelle de la substance examinée.
- b) Solubilité dans l'eau, les solvants organiques, les acides dilués et les solutions alcalines :

La solubilité est la quantité maximale d'une substance qui peut être dissoute dans un volume donné de solvant (**Ayadim et Habib, 2013**).

Mode opératoire :

-On introduit séparément 50 mg d'acide folique (AF) dans quatre tubes à essai.

-On ajoute 10 ml : d'eau dans le premier tube, d'alcool 96 % dans le deuxième, d'HCl dilué (1/10) dans le troisième, et d'une solution de NaOH 0,1 N dans le dernier. Ensuite on agite chacun des quatre tubes.

La lecture est effectuée par un simple examen visuel.

##### **2.2.1.1.2- Tests d'identification**

###### **a) Détermination du pouvoir rotatoire**

Une molécule contenant un (ou plusieurs) carbone(s) asymétrique(s) peut présenter une activité optique c'est-à-dire faire tourner la lumière polarisée. Pour observer cette déviation de la lumière polarisée, on utilise un polarimètre qui donne une mesure de l'angle de déviation de la lumière polarisée. Ensuite, on calcule le pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D$ ) par rapport à la concentration en substrat dans la cellule (**Rabasso, 2006**).

**Mode opératoire :**

On dissout 0,25 g d'acide folique (AF) dans de l'hydroxyde de Sodium (NaOH) 0,1 M et on complète à 25 ml avec le même solvant.

Après agitation, la solution obtenue est mise dans la cellule du polarimètre.

Un essai à blanc doit être préalablement effectué avec l'hydroxyde de Sodium.

Le pouvoir rotatoire est ensuite calculé par la formule suivante :

$$[\alpha]_D^{20} = [(\alpha \times V) / (Pe \times l)] \times [100 / (100 - Te)]$$

$[\alpha]_D^{20}$  : Le pouvoir rotatoire spécifique

$\alpha$  : Angle de rotation en degrés

V : le volume de solvant (ml)

pe : la masse de prise d'essai (g)

l : Longueur en décimètres du tube polarimètre

Te : la teneur en eau

- Limite : +18 à +22

**b) Chromatographie sur couche mince**

Technique analytique majeure dans les années soixante-dix, la chromatographie en couche mince est une méthode universelle, faisant partie des méthodes dites séparatives. Un extrait biologique est déposé sous forme de tache (spot) sur une plaque de verre recouverte d'une phase stationnaire, la plupart du temps de silice. La migration des produits est réalisée dans une chambre à développement au moyen d'un mélange de solvants appropriés. La révélation des molécules a lieu sous forme de taches colorées (**Danel et Barriot, 1999**).

**Mode opératoire**

✓ Préparation de la solution à examiner : On dissout 50 mg d'acide folique dans un mélange de 2 volumes d'ammoniaque concentrée et de 9 volumes de méthanol, et on complète à 100 ml avec le même mélange de solvants.

✓ Préparation de la solution témoin : On procède de la même façon que pour la préparation de la solution à examiner, mais en remplaçant l'acide folique à examiner par l'acide folique SCR (substance chimique de référence).

✓ Préparation de la phase mobile : l'éluant est composé de : 20 ml d'ammoniaque concentré, 20 ml de Propanol, et de 60 ml d'éthanol à 96%, on place 5 ml dans le fond de la cuve puis on referme le couvercle.

✓ Préparation de la phase stationnaire (la plaque au gel de silice) :

-On découpe la plaque aux dimensions 21 cm×20 cm, puis on trace au crayon, un trait à 1 cm du bas de la plaque. Sur ce trait, on trace 6 petits points à 1 cm de distance où seront déposées les taches.

-A l'aide d'une seringue stérile on dépose alternativement 3 gouttes de la solution à examiner et 3 gouttes de la solution témoin (chaque goutte correspond à environ 2 µl et elle est déposée sur l'un des points tracés).

Elution :

-On place la plaque dans la cuve, on ferme et on laisse l'éluant diffuser.

Révélation:

-On examine la plaque sous une lampe à l'ultra violet (UV) à une longueur d'onde de 365nm. L'identification se fait par une estimation visuelle de la tache du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner et la tache correspondante du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, en comparant la coloration et les dimensions.

### **c) La teneur en eau (Te)**

La détermination de la teneur en eau (Te) se fait par un appareil appelé «Karl Fischer» dont laquelle on introduit 0.15g d'acide folique (AF).

-Limite : 5% à 8,5%.

### **d) Taux des cendres sulfuriques (CS)**

**Mode opératoire :** (déterminé sur 1 g d'acide folique)

Chauffez un creuset approprié (de silice) à  $600 \pm 50$  °C pendant 30 min. Laissez refroidir dans un dessiccateur sur du gel de silice ou autre desséchant approprié puis pesez. Dans le creuset, introduisez la prise d'essai puis pesez. Humectez la substance à examiner avec un peu d'acide sulfurique (généralement 1 ml) et chauffez doucement, à une température aussi faible que possible, jusqu'à carbonisation complète de l'échantillon. Après refroidissement, humectez le résidu avec un peu d'acide sulfurique (généralement 1 ml). Chauffez doucement jusqu'à ce

qu'il n'y ait plus de dégagement de fumées blanches, puis calcinez à  $600 \pm 50$  °C jusqu'à incinération complète du résidu. Veillez à ce qu'il n'y ait aucune émission de flammes lors du procédé. Laissez refroidir le creuset dans un dessiccateur sur du gel de silice ou autre desséchant approprié, puis pesez à nouveau et calculez le pourcentage de résidu (**Pharmacopée Européenne, 2008**).

- Le taux des cendres sulfuriques est obtenu par l'application de la formule suivante :

$$CS(\%) = [(Pf - Pv) / Pe] \times 100$$

CS(%) : Pourcentage des cendres sulfuriques

pe : Prise d'essai (g)

Pv: Poids vide

Pf : Poids final

-Limite: le taux ne doit pas être supérieur à 0,2%.

#### e) Dosage par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une technique analytique clé, utilisée dans de nombreux secteurs d'activité, pour l'analyse de matrices agroalimentaires, environnementales et pharmaceutique (**Guillarme, 2014**).

La chromatographie liquide haute performance s'en distingue par l'utilisation de colonnes de petit diamètre, remplies d'un matériau constitué de particules extrêmement fines. De plus, une pompe assure l'introduction de la phase mobile dans la colonne sous une pression **très** élevée. La détection se fait grâce à des systèmes optiques, par une absorption de lumière ultra violette (spectrophotomètre U.V) (**Courtot et Jaussaud, 1990**).

Les variations de tension produites à la sortie du détecteur sont enregistrées sous la forme d'un chromatogramme (**Courtot et Jaussaud, 1990**).

#### Préparation de la solution à examiner

On dissout 0,1 g d'acide folique dans 5 ml d'une solution de Carbonate de Sodium à 28,6 g/l et on complète à 100 ml avec la phase mobile. On Prélève 2,0 ml de cette solution et on complète à 10 ml avec la phase mobile.

### **Préparation de la solution témoin**

-On Procède de la même façon que pour la solution à examiner, en substituant l'acide folique par l'acide folique SCR.

### **Préparation de la phase mobile**

On mélange 12 volumes de Méthanol et 88 volumes d'une solution contenant 11,16 g/l de Phosphate monopotassique et 5,50 g/l de phosphate dipotassique.

**La phase stationnaire :** gel de silice octylsilylé.

### **Conditions chromatographiques**

-Colonne : Discovery C8 (250 ×4) mm.

-Débit : 0,6ml/min.

-Volume à injecter : 20 µl.

-Détecteur : Waters 2487 (Dual absorbance detector) couplé à un ordinateur Digital PC muni d'un logiciel spécialisé de référence MILLENIUM<sup>32</sup>.

- Longueur d'onde de détection : 280 nm.

- Temps de rétention : environ 8,5 min.

La dose de l'acide folique est calculée par la formule suivante :

$$AF \% = (Ae / At) \times (Pt / Pe) \times 100$$

AF% : pourcentage de l'acide folique.

Ae : surface du pic de l'acide folique obtenu avec la solution témoin.

At : surface du pic de l'acide folique obtenu avec la solution à examiner.

Pt : prise d'essai du témoin.

pe : prise d'essai.

-Limite : 90% à 102%.

### **2.2.1.2- Excipient (amidon de Maïs)**

Il est extrait du caryopse de Zea de Maïs.

#### **2.2.1.2.1- Caractères**

**a) Aspect :**

-On procède de la même façon que pour le principe actif.

**b) Solubilité dans l'eau froide et dans l'éthanol à 96% :**

- Dans un tube à essai, on ajoute à 50 mg d'amidon de Maïs, 10 ml d'eau froide.

Dans un autre tube à essai, on procède de la même façon, en remplaçant l'eau froide par l'éthanol à 96 %.

#### **2.2.1.2.2- Test d'identification (Réaction de coloration par l'iode)**

On chauffe à ébullition une suspension de 1g d'amidon de Maïs dans 50 ml d'eau pendant 1 min.

- Après refroidissement, il se forme un empois, trouble et liquide.

- A 1 ml de l'empois formé, on ajoute 0,05 ml de solution d'iode, et on effectue la lecture par observation visuelle.

#### **2.2.1.2.3- Essais**

**a) Détermination du pH**

-On agite 5g d'amidon de Maïs avec 25ml d'eau exempte de dioxyde de carbone pendant une minute et on laisse reposer pendant 15 minutes.

-Par la suite, on plonge l'électrode du pH-mètre dans un bêcher contenant 20 ml de la solution obtenue précédemment, et la lecture se fait directement sur l'écran d'affichage.

-Limite : 4 à 7 avec  $T = 22,8\text{ C}^\circ$ .

**b) Fer**

-On dissout 1,5g d'amidon de maïs dans l'acide chlorhydrique dilué (1/10) et on complète à 15 ml avec le même solvant.

-Après agitation et filtration de notre préparation, on ajoute 2 ml d'une solution d'acide citrique à 200g/l et 0,1 ml d'acide thioglycolique et on mélange.

- On alcalinise avec de l'ammoniaque, puis on complète à 20 ml avec de l'eau distillé.
- Le témoin est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant la suspension d'amidon de maïs par 10 ml d'une solution à 1 ppm (partie par million) de fer.
- La lecture se fait par examen visuel après 5 minutes.
- Limite : au maximum 50 ppm.

**c) La perte à la dessiccation****Mode opératoire**

- On procède à la pesée de flacon vide préalablement desséchée à l'étuve.
- On pèse 1g d'amidon de maïs dans le flacon tarée et par la suite on place l'ensemble dans une étuve à 130 °C pendant 90 minutes.
- Après refroidissement pendant 15 minutes dans un dessiccateur, on pèse le flacon.
- Le pourcentage de la perte à la dessiccation est calculé par la formule suivante :

$$P\% = [(P_v + P_e) - P_f] / P_e \times 100$$

P% : Pourcentage de la perte à la dessiccation

P<sub>v</sub> : Poids vide de flacon

P<sub>f</sub> : Poids final de flacon

P<sub>e</sub> :Prise d'essai

-Limite : au maximum 15%.

**d) Les cendres sulfuriques**

On procède de la même façon que pour le principe actif. Le pourcentage des cendres sulfuriques est déterminé sur 1g d'amidon de maïs.

-Limite : au maximum 0,6 %.

### 2.2.1.3- Le produit fini

a) **Caractères organoleptiques** : On procède de la même façon que pour le principe actif et l'excipient.

#### b) Le poids moyen

A l'aide d'une balance précise, on effectue la pesée sur 10 comprimés à la fois, ensuite on calcule le poids moyen.

$$Pm = Pt / 10$$

Avec : Pm : Poids moyen

Pt : Poids total des comprimés

-Limite : 92,5 mg à 107,5 mg.

#### c) Uniformité de masse

- Ce test est destiné à déterminer la masse unitaire des comprimés.

-A l'aide d'une balance précise, on pèse individuellement 20 comprimés, puis on compare la masse de chaque comprimé pesé, avec la masse moyenne.

-limite : La masse individuelle de 2/20 Cps au plus peuvent s'écarter du poids moyen de 7,5%, mais la masse d'aucun Cp ne peut s'écarter de plus de 15%.

#### d) Friabilité

Le phénomène par le quel la surface des comprimés est endommagée, ou présente des signes d'abrasion ou de rupture sous l'effet de choc mécanique ou d'une attrition (**Pharmacopée Européenne, 2008**).

L'appareil utilisé est constitué d'un tambour rotatif transparent. L'une des faces du tambour est amovible. A chaque rotation les comprimés roulent ou glissent et tombent d'une hauteur d'environ 130 mm sur la paroi du tambour ou les uns sur les autres où ils vont subir des frottements et des chutes pendant un temps déterminé. Le test est réalisé sur un échantillon de 20 comprimés, ces derniers sont pesés au début et à la fin de rotation qui dure 4 minutes, et on calcule par la relation suivante :

$$F = [ (P_i - P_f) / P_i ] \times 100$$

F : Friabilité.      P<sub>i</sub> : Poids des Cps avant le test.      P<sub>f</sub> : Poids des Cps après le test.

-Limite : ≤ 1%.

### e) Temps de délitement

Le but de cet essai est de déterminer la plus ou moins grande aptitude des comprimés à désagréger en milieu liquide dans le temps prescrit.

### Mode opératoire

-L'appareil comprend six tubes munis chacun d'un disque facilitant la désagrégation.

-L'assemblage est placé dans un vase cylindrique rempli avec de l'eau distillée.

-La température du milieu aqueux doit être maintenue à 37°C.

-On place un comprimé dans chacun des 6 tubes de l'appareil et on introduit les disques, puis on fait fonctionner l'appareil. Les comprimés sont donc soumis à un mouvement d'agitation régulier jusqu'à désagrégation complète, et on note le temps de désagrégation.

-Limite : ≤ 15 min.

### f) Identification

-On dissout une prise d'essai, exactement pesée, de poudre de comprimés voisine de 200 mg dans une fiole de 100 ml avec une solution aqueuse de NaOH 0,1 N, et on complète le volume au trait de jauge.

-Après filtration, on effectue une dilution au 1/10 à l'aide de NaOH 0,1 N.

Avec un spectrophotomètre, on procède à la lecture de la densité optique de la solution préparée aux deux longueurs d'onde 256 nm et 365 nm. Ensuite on calcule le rapport  $A_{256}/A_{365}$ .

Avec :

$A_{256}$  = Absorbance à 256 nm       $A_{365}$  = Absorbance à 365 nm

Le rapport doit être compris entre 2.8 et 3.

**g) Dosage de l'acide folique**

Préparation de la solution essai : C'est la même solution utilisée pour l'identification.

Préparation de la solution étalon :

Sur une prise d'essai de 100 mg de principe actif, on procède de la même façon que la solution essai en faisant une dilution au 1/100.

On lit la densité optique des deux solutions au spectrophotomètre à 256 nm, en réglant le zéro de l'appareil avec NaOH 0.1N.

La teneur en acide folique (mg/ cp) est donnée par la relation suivante :

$$(DO \text{ essai} / DO \text{ étalon}) \times (PE \text{ étalon} / PE \text{ essai}) \times (PM/10)$$

DO essai : Densité optique de la solution essai.

DO étalon : Densité optique de la solution étalon.

PE étalon : Prise d'essai de la solution étalon.

PE essai : Prise d'essai de la solution essai.

PM : Poids Moyen

-Limite : 4,5 mg/cp à 5,5 mg/cp.

**2.3- Contrôle microbiologique du produit fini**

Pour faciliter le contrôle microbiologique, les Pharmacopées ont préconisé des protocoles de travail pour les différents types de médicaments. Dans le cas de Zanitra® 5mg, elles recommandent :

- ✓ Le dénombrement des germes aérobies viables totaux.
- ✓ La recherche de micro-organismes spécifiés (Entérobactéries, *E.coli*, *S.aureus*, et *Salmonella sp.* ).

### 2.3.1- Dénombrement des germes viables totaux

Plusieurs méthodes de culture sur boîte sont utilisables pour dénombrer les cellules viables dans un échantillon. On les désigne comme les méthodes de comptage viable parce qu'elles ne comptent que les cellules vivantes et capables de se reproduire. Les deux techniques habituellement utilisées sont celle de l'étalement en surface et celle de l'étalement en profondeur (Prescott et al., 2010).

#### a) Préparation des dilutions

##### Dilution $10^{-1}$ :

On pèse presque 100 comprimés de Zanitra®, ce qui est équivalent à un poids de 10 g, et on les dilue dans 90 ml d'une solution tampon peptonnée au chlorure de sodium à pH=7, et contenant du tween. Ce qui correspond à la dilution  $10^{-1}$  (homogénéisât A). On réalise deux autres dilutions ( $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) :

##### Dilution $10^{-2}$ :

On prend 1 ml à partir de l'homogénéisât A et on le met dans un tube contient 9 ml de même solution tampon utilisé pour la première dilution  $10^{-1}$ .

##### Dilution $10^{-3}$ :

On prend 1 ml à partir de la dilution  $10^{-2}$  et la mettre dans un tube contenant 9 ml de même solution tampon utilisé dans les dilutions précédentes.

#### 2.3.1.1-Recherche des bactéries viables totales

Cette méthode consiste à dénombrer les bactéries viables et revivifiables (c'est-à-dire aptes à se diviser) par une mise en culture d'un échantillon et de ses dilutions décimales sur un milieu solide en boîte de Pétri. Le nombre de cellules viables cultivables est estimé par comptage des colonies formées pendant l'incubation par rapport au volume de l'échantillon testé (Gazengel et Orecchioni, 2013).

**Mode opératoire :**

On utilise deux boîtes de Pétri pour chaque dilution ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ).

-L'ensemencement se fait en profondeur : on introduit dans chaque boîte de Pétri, 1ml de la dilution concernée, puis on ajoute 20 ml d'un milieu gélose liquéfié à base de peptones de caséine de Soja, voir figure 7.

-Par la suite, on incube à l'étuve à une température de 37°C pendant 5 jours, voir figure 7.

✓ Lecture :

Lors de la lecture, on procède d'abord à la sélection des boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300.

On fait par la suite, la moyenne arithmétique des dénombrements des deux boîtes de la dilution concernée et on calcule le nombre d'UFC par gramme de produit selon la formule suivante:

$$N = m \times [1/(V \times D)]$$

N : nombre de colonies (UFC/g).

m : nombre moyen de colonies.

V : volumeensemencé (ml).

D : Dilution utilisée.

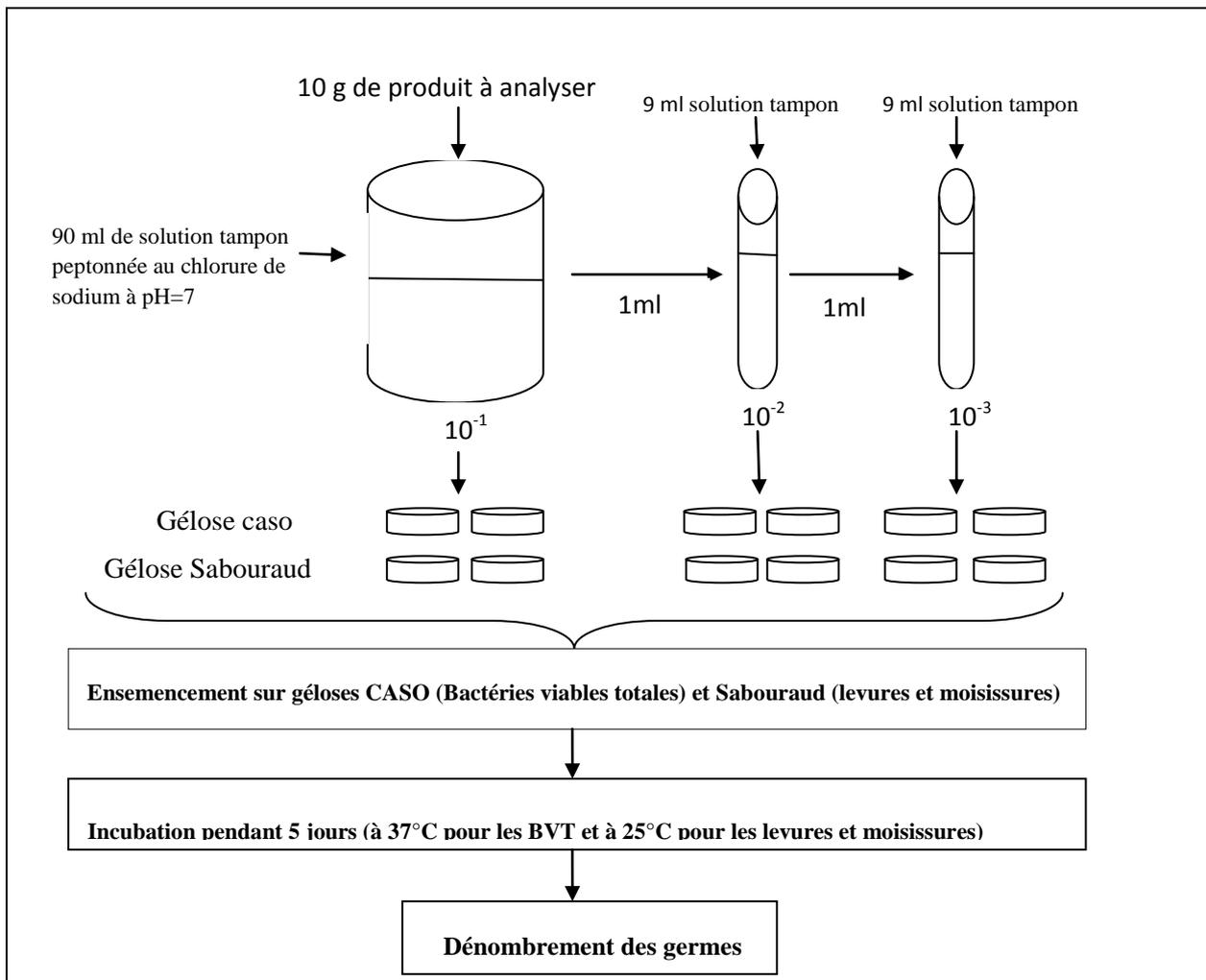
**2.3.1.2-Recherche des levures et moisissures**

Se fait de la même façon que des bactéries viables totales (BVT) sauf qu'on remplace le milieu gélose liquéfié à base de peptones de caséine de Soja par un milieu gélose liquéfié Sabouraud –glucosé-gélosé comme indique dans la figure 7.

-Par la suite, on incube à l'étuve à une température de 25°C pendant 5 jours.

Lecture :

Lors de la lecture, on procède d'abord à la sélection des boîtes contenant un nombre de colonies supérieur à 10 et inférieur à 100, et le dénombrement se fait de la même façon que les bactéries viables totales.



**Figure 7 :** Dénombrement des bactéries viables totales et des levures et moisissures.

### 2.3.2- La recherche de microorganismes spécifiques

#### a) Recherche des entérobactéries

-Les *entérobacteriaceae* sont des petits bacilles gram négatifs, mobiles par des flagelles péritriches ou immobiles (**Dromigny, 2012**).

-Qui se développent en la présence et en l'absence d'oxygène (**Dromigny, 2012**).

-Les *entérobacteriaceae* sont les micro-organismes formant des colonies caractéristiques sur gélose au cristal violet, à la bile et au glucose (**Dromigny, 2012**).

-Dans le cas du VRBG (gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre), les entérobactéries fermentent tout le glucose et vont se différencier par un rougissement du milieu et de la colonie par production d'acides et virage du rouge neutre (**Branger et al., 2007b**).

**Pré-enrichissement**

On pèse 100 comprimés de Zanitra® 5mg, ce qui est équivalent à un poids de 10 g, on les dilue dans 90ml de bouillon lactosé, et on homogénéise afin d'obtenir « l'homogénéisât B ».

-On incube à 37 °C pendant 4 heures.

**Enrichissement**

-Après agitation, on prélève 1 ml et on l'ajoute à 9 ml du bouillon Mossel qui est le milieu d'enrichissement pour les entérobactéries (solution 10<sup>-1</sup>).

-On prend 1 ml de solution 10<sup>-1</sup> et on l'ajoute à 9 ml du bouillon Mossel (solution 10<sup>-2</sup>).

-De même façon on prépare la dilution 10<sup>-3</sup> à partir de la solution 10<sup>-2</sup>.

-On incube à 37 °C pendant 48 heures, voir figure 8.

-La présence d'un trouble au niveau des tubes, indique la présence des entérobactéries.

**Isolement**

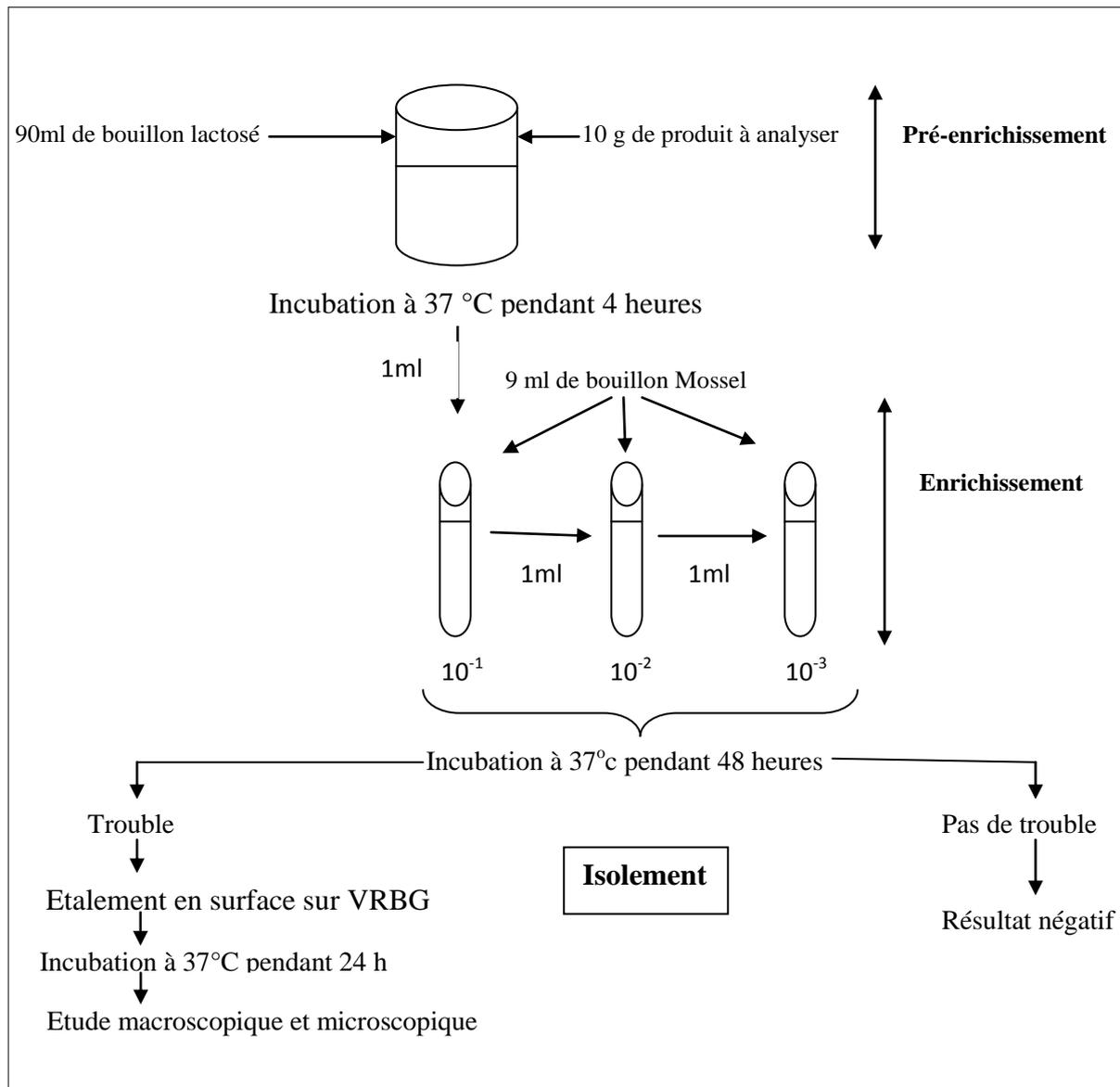
-A partir des tubes positifs, on effectue un ensemencement par étalement sur la gélose VRBG, et on incube à 37 °C pendant 24 heures, figure 8.

**Lecture****Etude macroscopique**

L'observation à l'œil nu permet de différencier les colonies obtenues. Un résultat positif se traduit par la croissance des colonies bien développées généralement rouges ou rougeâtres.

**Etude microscopique :**

Cette étude permet la détermination de la forme, la mobilité et le mode de regroupement des cellules bactérienne. Les entérobactéries apparaissent sous forme de bacilles mobiles.



**Figure 8:** Différentes étapes de la recherche et d'identification des entérobactéries.

### b) Recherche d'*Escherichia coli*

*E. coli* est l'hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud (Delarras, 2010). Elle résiste à la bile et au pH acide de l'estomac. Sa température optimale de croissance est proche de celle du corps humain. Elle se développe alors très rapidement. Son temps de doublement est de l'ordre de 20 min. Bien sûr, elle peut aussi se développer et survivre dans de nombreux environnements extérieurs (Briandet et al., 2012).

### **Pré-enrichissement**

- A partir de l'homogénéisât A, on prélève 10 ml et on les ensemence dans 90 ml de milieu liquide à base de peptones de caséine de Soja, et on incube à 37°C pendant 24 heures.

### **Enrichissement**

- Après incubation, on agite puis on prélève 10 ml et on ensemence dans 90 ml du milieu liquide Mac Conkey, et On incube à 44°C pendant 24 heures.

### **Isolement**

A partir des tubes positifs (présentant un trouble), on fait un ensemencement par étalement sur une boîte pétri contenant gélose Mac Conkey, et on incube à 37°C pendant 72 heures.

### **Lecture**

La présence de *E. coli* se manifeste par des colonies roses à rouges brique non muqueuses.

### **c) Recherche de *Staphylococcus aureus***

Est fréquemment rencontré chez l'homme. Il peut être responsable d'infections cutanées (impétigo, furoncles...), de la sphère ORL (sinusites, otites...), d'infection diverses et d'infection septicémiques redoutables (**Delarras, 2014**).

### **Enrichissement**

C'est la même méthode de pré-enrichissement d'*Escherichia coli*.

### **Isolement**

On fait un ensemencement par étalement sur boîte de Pétri contenant de la gélose Vojel Johnson, et on incube à 37 °C pendant 72 heures.

### **Lecture**

La présence de petites colonies noires avec un halo jaune indique la présence de *S. aureus*.

**d) Recherche des Salmonelles**

Les salmonelles sont des bâtonnets gram négatifs motiles aérobies qui typiquement ne fermentent pas le lactose et sont pathogènes pour l'homme et les animaux par voie orale (Jawetz *et al.*, 1973).

**Pré-enrichissement**

On introduit 10 g de l'échantillon à analyser dans 90 ml de bouillon à base de peptone de caséine de Soja, après avoir homogénéisé le mélange soigneusement, on incube à 37 °C pendant 24 heures.

**Enrichissement**

-On ensemence 1 ml de la culture précédente dans 9 ml de bouillon au Tétrathionate-bile-vert-brillant (TBG).

-On incube par la suite à 44°C pendant 24 heures.

**Isolement**

Au cas où il y a des tubes positifs (présentant un trouble), on ensemence par étalement quelques gouttes de la culture précédente dans deux boîtes de Pétri, la première contenant le milieu gélose vert brillant-rouge de phénol-lactose-saccharose (BPLS) et la seconde le milieu gélose Xylose-lysine- désoxycholate (XLD).

-On incube par la suite à 37°C pendant 72 heures.

**Lecture**

-Sur milieu BPLS : Des colonies petites transparentes incolores, ou d'une coloration allant du rose au blanc opaque, souvent entourées d'une zone rose à rouge indiquent la présence de Salmonelles.

-Sur milieu gélose Xylose-lysine- désoxycholate : Colonies bien développées rouge ou rougeâtres avec ou sans centre noir.

## 2.4- Contrôle toxicologique

### Principe

Le test consiste à administrer par voie intra-gastrique (orale) à des souris albinos de race Swiss une dose du produit relativement élevée par rapport à la dose thérapeutique afin de déceler la présence d'une ou plusieurs anomalies de nature variée du produit.

### Mode opératoire

-L'essai est pratiqué sur 5 souris albinos de race Swiss, sélectionnées au hasard et pesés le jour de l'essai, leurs poids doit être compris entre 17 et 24g, ils doivent être du même sexe (dans notre cas, c'est le sexe femelle). Les souris sont privées de nourriture, sauf de l'eau, pendant 12 heures.

-Dans un mortier on broie 6 comprimés de Zanitra® 5 mg, on ajoute 10ml de Na Cl à 0,9% puis on homogénéise.

-On administre 0,5ml de cette solution à chaque souris à l'aide d'une sonde de Gavage gastrique.

Dose journalière pour les souris :

$$\begin{array}{l} 5\text{mg} \longrightarrow 60\text{kg} \\ x \longrightarrow 1\text{kg} \end{array} \quad x = [(5 \times 1) / 60] = 0.083 \text{ mg / kg}$$

Une souris pèse 20 g :

$$\begin{array}{l} 0.083\text{mg} \longrightarrow 1000\text{g} \\ x \longrightarrow 20\text{g} \end{array} \quad x = [(20 \times 0.083) / 1000] = 0.0016 \text{ mg / souris}$$

Dose journalière pour une souris = 0.0016 mg / souris.

Dose administré pour une souris = 0.25mg, qui est l'équivalent de 150 fois la dose journalière.

**Lecture :** Elle consiste à noter la mort ou non des souris dans les 48 heures qui suivent le test.

*Résultats*  
*ET*  
*Discussion*

## II. Résultats et Discussion

### 1. Résultats du Contrôle physico-chimique des matières premières et du produit fini

#### 1.1- Résultats de l'Acide folique

Les résultats du contrôle physico-chimique de l'acide folique sont représentés dans le tableau IV, ces résultats concernent :

- Les caractères organoleptiques : Aspect et solubilité.
- L'identification physico-chimique : Par l'étude du pouvoir rotatoire et la chromatographie sur couche mince.
- Les essais limites : Comprenant la teneur en eau, le taux des cendres sulfuriques, et le dosage de l'acide folique.

**Tableau IV** : Résultats de l'analyse physicochimique de l'Acide folique

	Test	Résultats	Norme (PE, 2008)	Etat
Caractères organoleptiques	Aspect	Poudre cristalline jaunâtre ou orangée	Poudre cristalline jaunâtre ou orangée	Conforme
	Solubilité dans : - L'eau - Les solvants organiques - Les acides dilués - Les solutions alcalines	- insoluble - insoluble - Soluble - Soluble	insoluble dans l'eau et solvant organiques et Soluble dans les acides dilués et les solutions alcalines	Conforme
Identification physico-chimique	pouvoir rotatoire	+20,52	De + 18 à + 22	Conforme
	Chromatographie sur couche mince	La tache principale du chromatogramme de la Solution à examiner est semblable à celle de la solution témoin	La tache principale du chromatogramme de la Solution à examiner est semblable à celle de la solution témoin	Conforme
essais limites	Teneur en eau	7.62%	De 5% à 8,5%	Conforme
	Cendres sulfuriques	0.12%	< 0,2 %	Conforme
	Dosage de l'acide folique par HPLC	99.30%	90% - 102%	Conforme

**Interprétation des résultats**

D'après le tableau IV :

- ✓ On constate que l'acide folique étudié se présente sous forme d'une poudre cristalline jaunâtre. Leur aspect correspond donc à la norme établie par la Pharmacopée Européenne (2008).
- ✓ Concernant la solubilité, on constate que l'acide folique est pratiquement insoluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques, mais il se dissout dans les acides dilués et les solutions alcalines.
- ✓ Le pouvoir rotatoire établie est de +20.52, il montre donc une conformité à la norme (il doit être entre +18 et + 22) selon la Pharmacopée Européenne (2008) (tableau IV).
- ✓ Pour la chromatographie sur couche mince, nous constatons que La tache principale du chromatogramme de la solution à examiner est semblable quant à sa position, sa fluorescence et ses dimensions à celle de la solution témoin, et cela pour l'échantillon étudié.
- ✓ Concernant la teneur en eau, le résultat obtenu est de 7.62%. on constate que ce résultat est conforme à la norme qui est de 5% à 8.5% selon la Pharmacopée Européenne (2008) (tableau IV).
- ✓ le taux de cendre sulfurique obtenu est de 0.12%. Ce taux est inférieur à la limite tolérée qui est de 0,2 % selon la Pharmacopée Européenne (2008) (tableau IV).
- ✓ les chromatogrammes de dosage de l'acide folique par HPLC montrent une similitude entre le pic de la solution témoin et celui de la solution essai (voir figure 9 et 10). Le résultat du dosage de l'acide folique est de 99.30% (tableau IV), il est donc conforme à la norme (doit être entre 90 % et 102 %) selon la Pharmacopée Européenne (2008).

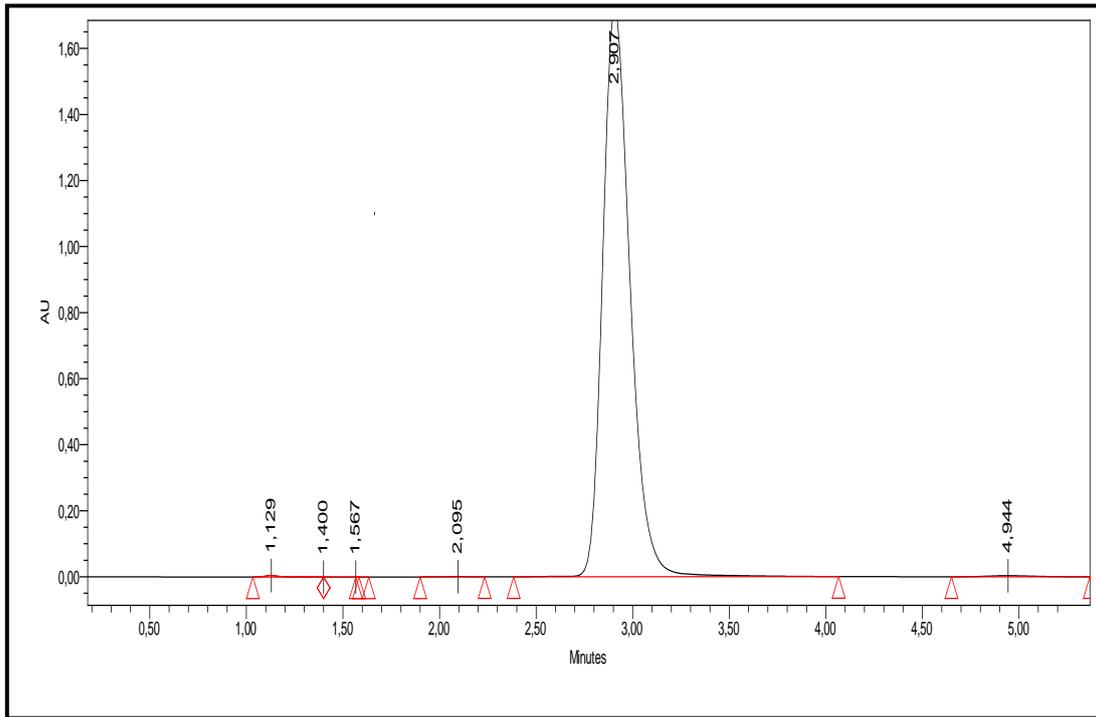


Figure 9: Chromatogramme de témoin.

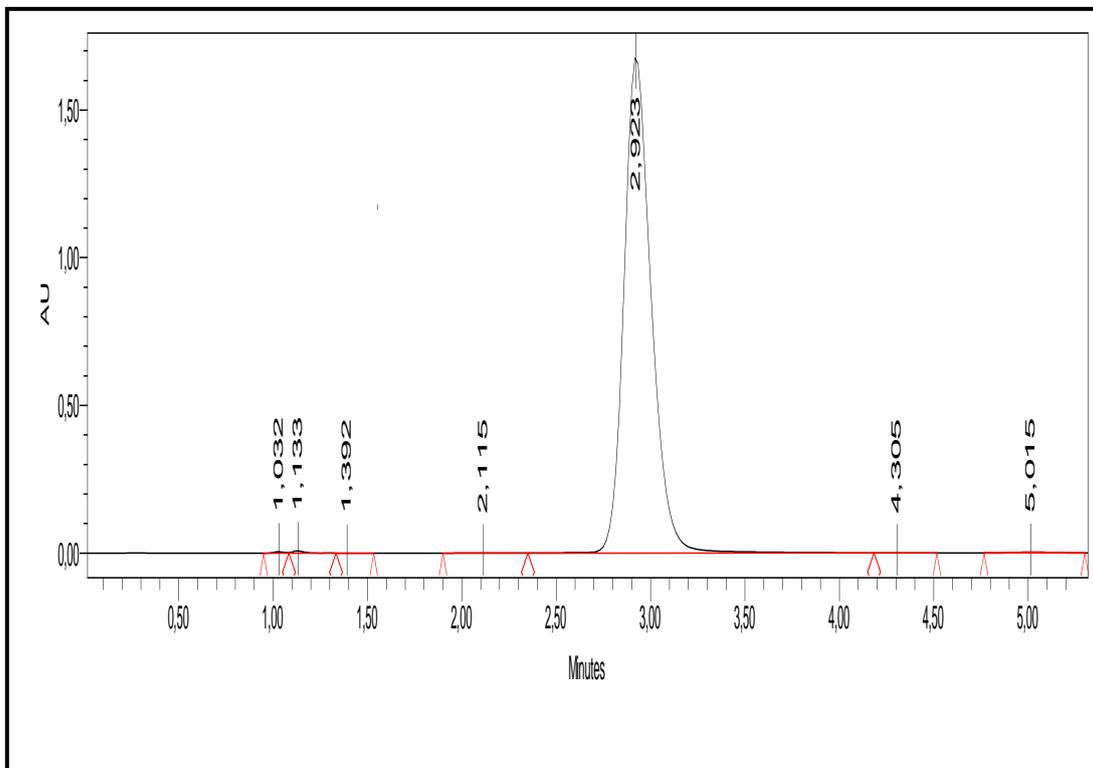


Figure 10: Chromatogramme de l'essai.

**Discussion :**

L'étude de l'aspect de l'acide folique a donné une idée initiale sur la nature et la qualité de la matière analysée.

Concernant la solubilité : bien que l'acide folique (vitamine B9) soit classé parmi les vitamines hydrosolubles dans la plupart des ouvrages, mais selon **Frénot et Vierling(2001)**, l'acide folique se présente sous forme d'une poudre jaune orangé. Il est soluble dans les acides et les bases diluées, peu soluble dans l'eau, insoluble dans l'éthanol, l'acétone, l'éther et le chloroforme.

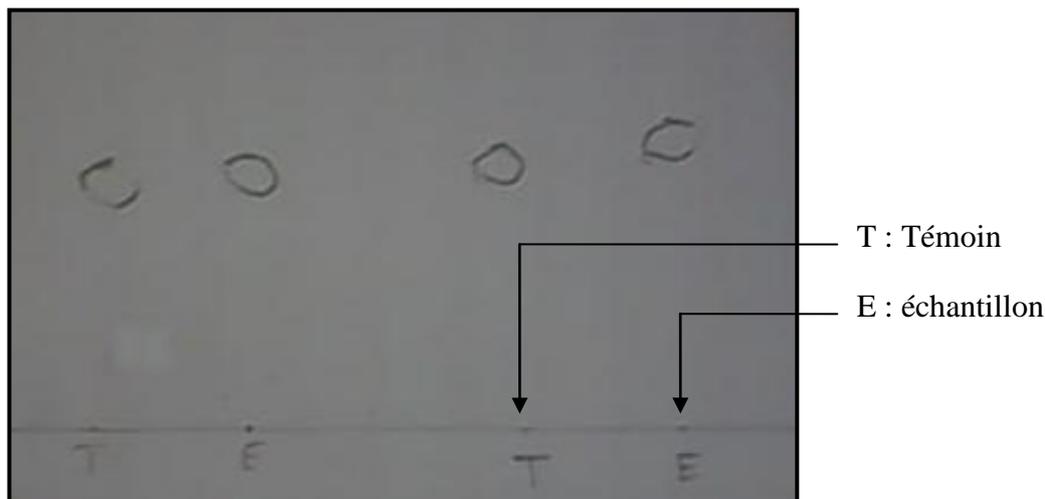
Ce paradoxe fait de l'étude de la solubilité de l'acide folique dans l'eau, un critère important à étudier.

Quant à l'étude de la solubilité de l'acide folique dans l'eau, les solvants organiques, les acides dilués, et les solutions alcalines, nous a permis de confirmé que l'acide folique est pratiquement insoluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques, mais il se dissout dans les acides dilués et les solutions alcalines idée de **Frénot et Vierling(2001)**.

Selon **Depovere (2005)**, toute molécule chirale est douée de pouvoir rotatoire ; lorsqu'elle est traversée par un faisceau de lumière polarisée plane, elle provoque une rotation dextrogyre ou lévogyre du plan de polarisation.

Donc à partir de notre résultat du pouvoir rotatoire (+20,52), nous concluons qu'il existe un carbone asymétrique qui représente donc un centre de chiralité au niveau de la structure de l'acide folique.

Selon **Kaloustian et Hadji Minaglou (2012)**, l'application principale de la chromatographie sur couche mince (CCM) est d'identifier les constituants d'un mélange. Pour cela notre résultat de la CCM (voir figure 11) détermine que la matière analysée est l'acide folique puisque La tache principale du chromatogramme de la solution à examiner est semblable quant à sa position, et ses dimensions à celle de la solution témoin.



**Figure 11** : Photographie représente le résultat de la chromatographie sur couche mince.

-Pour les essais limités:

Le résultat de la teneur en eau nous renseigne sur la bonne déshydratation et conservation du principe actif, ce qui limite les risques de contamination microbienne par la diminution de l'activité de l'eau car selon **Delarras (2014)**, les micro-organismes exigent pour leur croissance un certain seuil d'humidité, sinon ils ne se développent pas.

Quant au faible taux des cendres sulfuriques, il nous permet de déduire que l'acide folique ne contient pas d'impuretés minérales. Cela est d'une grande importance, car ces dernières peuvent comporter des substances toxiques et dangereuses pour la santé, pouvant diminuer l'effet thérapeutique du produit pharmaceutique, ou rendre les effets secondaires d'une très grande gravité.

**Selon Kirkiacharian (2007)**, Le dosage du principe actif est également obligatoire, car il permet de s'assurer de la présence du médicament en concentration conforme aux normes du produit.

Donc à partir du résultat représenté sur le tableau IV, le dosage par HPLC nous a indiqué la conformité de dose du principe actif à la norme décrite dans la Pharmacopée Européenne (2008), et aussi la pureté de ce dernier vu l'absence de pics parasites.

## 1.2- Résultats de l'amidon de maïs

Les résultats obtenus lors de l'analyse de l'amidon de maïs sont représentés dans le tableau V.

Ces résultats concernent :

- ✓ Les caractères organoleptiques : Aspect et solubilité.
- ✓ L'identification physicochimique : Par chauffage à ébullition et coloration avec l'iode.
- ✓ Les essais limites : pH, le fer, et la perte à la dessiccation.

**Tableau V** : Résultats de l'analyse physicochimique de l'Amidon de Maïs

	Tests	Résultat	Norme (PE, 2008)	Etat
caractères organoleptiques	Aspect	Poudre d'un blanc mat à faiblement jaunâtre, très fine, qui crisse sous la pression des doigts.	Poudre d'un blanc mat à faiblement jaunâtre, très fine, qui crisse sous la pression des doigts.	Conforme
	Solubilité dans l'eau froide et dans l'éthanol à 96%.	Insoluble dans l'eau froide et dans l'éthanol à 96 %.	Insoluble dans l'eau froide et dans l'éthanol à 96 %.	Conforme
identification	Chauffage à ébullition	Formation d'un empois trouble et liquide.	Formation d'un empois trouble et liquide.	Conforme
	Coloration avec l'iode	Coloration rouge-orange à bleu foncé qui disparaît par chauffage	Coloration rouge-orange à bleu foncé qui disparaît par chauffage	Conforme
essais limites	pH	6.39	4 à 7	Conforme
	Le fer	La coloration rose éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle du témoin.	La coloration rose éventuelle de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle du témoin.	Conforme
	Perte à la dessiccation	9.85%	≤15%	Conforme
	Cendres sulfuriques	0.06%	≤0.6	Conforme

**Interprétation des résultats :**

D'après le tableau V :

✓ Nous avons constaté que pour l'échantillon étudié, l'amidon de maïs se présente sous forme d'une poudre d'un blanc mat à faiblement jaunâtre, très fine, et qui crisse sous la pression des doigts. Il est pratiquement insoluble dans l'eau froide et dans l'éthanol à 96%. L'Amidon de Maïs présente donc un aspect, et des caractères de solubilité conformes aux normes de la Pharmacopée Européenne (2008).

✓ Après chauffage à l'ébullition de la suspension d'amidon de maïs il s'est formé un empois trouble qui s'est coloré en rouge-orange à bleu foncé en réagissant avec l'iode. Ce résultat nous permet de dire que l'identification de l'amidon de maïs s'est révélée positive.

✓ Le pH de la solution d'amidon de maïs est de 6.39, Il est donc conforme à la norme (entre 4et 7) de la Pharmacopée européenne (2008) (tableau V).

✓ Concernant le fer, la coloration rose de la solution à examiner n'est pas plus intense que celle du témoin, conformément à la norme selon la Pharmacopée Européenne (2008).

✓ Le taux de la perte à la dessiccation est de 9.85%. Le résultat de ce paramètre est dans la norme (il doit être  $\leq 15\%$ ) (tableau V).

Pour le taux de cendre sulfurique, le résultat obtenu est de 0.06%. Ce taux est inférieur à la limite tolérée qui est de 0,6 %, ce qui permet de dire qu'il est conforme à la norme.

**Discussion**

L'étude des caractères organoleptiques a les mêmes intérêts que ceux cités pour le principe actif.

Concernant la solubilité, d'après **Charreau et al. (2006)**, l'amidon est insoluble dans l'eau froide. L'amidon se solubilise avec l'élévation de température.

Donc notre résultat est similaire à celle de **Charreau et al. (2006)**.

Le résultat du pH (qui est égale à 6.39), est comparable à celle de **Khaber Azi en 2011** (pH=6.5), ces résultats indiquent l'absence d'impuretés alcalines ou acides au niveau de l'excipient.

Le résultat du fer est semblable à celles de **Khaber Azi (2011)**, elle témoigne de l'absence d'impuretés de nature ferrique ainsi que le faible taux de la perte à la dessiccation

(9.85%) est comparable à celui trouvé par **Khaber Azi en 2011**(qui est de 8 %), ce faible taux indique la bonne déshydratation et la bonne conservation de l'amidon de maïs.

Comme il a été déjà mentionné précédemment pour le principe actif (acide folique), le faible taux des cendres sulfuriques permet de déduire que l'amidon de maïs ne contient pas d'impuretés minérales.

L'ensemble des résultats obtenus, va permettre de dire que cet excipient est d'une qualité satisfaisante et répond aux normes de la Pharmacopée Européenne (2008).

### 1.3- Résultats de contrôle physicochimique du produit fini

Les résultats du produit fini sont montrés dans le tableau VI et concernent :

- ✓ Les caractères organoleptiques : Aspect.
- ✓ L'identification physicochimique : Par spectrophotométrie.
- ✓ Les essais limites : Incluant le poids moyen, l'uniformité de masse, la friabilité, le temps de délitement, et le dosage de l'acide folique.

**Tableau VI** : Résultats du contrôle physicochimique du produit fini

Tests		Résultat	Norme (PE, 2008)	Etat
<b>Caractères organoleptiques</b>	<b>Aspect</b>	Comprimés jaunes, ronds, aux bords chanfreinés, lisses et brillants.	Comprimés jaunes, ronds, aux bords chanfreinés, lisses et brillants.	conforme
<b>identification</b>	<b>Spectrophotométrie</b>	2,9	$2,8 \leq A_{256}/A_{365} \leq 3$	conforme
<b>essais limites</b>	<b>Poids moyen</b>	100,2 mg	92,5mg à 107,5mg	conforme
	<b>Uniformité de masse</b>	La masse individuelle de 2/20 Cps au plus peuvent s'écarter du poids moyen de 7,5%, mais la masse d'aucun Cp ne peut s'écarter de plus de 15%.	La masse individuelle de 2/20 Cps au plus peuvent s'écarter du poids moyen de 7,5%, mais la masse d'aucun Cp ne peut s'écarter de plus de 15%.	conforme
	<b>Friabilité</b>	0,28%	$\leq 1\%$	Conforme
	<b>Temps de délitement</b>	1 min 35s	$\leq 15\text{min}$	Conforme
	Dosage de l'acide folique	5,12 mg/cp	De 4,5 mg/cp à 5,5 mg/cp	conforme

**Interprétation des résultats :**

D'après le tableau VI :

- ✓ Les comprimés testés ont une forme ronde, aux bords chanfreinés, lisses, brillants, conformément aux normes établie par la Pharmacopée Européenne (2008).
- Le rapport  $A_{256}/A_{365}$  est dans l'intervalle [2.8 , 3], il est donc conforme à la norme décrite par la pharmacopée européenne (2008).
- Concernant la masse moyenne, aucun comprimé ne s'est écarté de l'intervalle [-7, 5%, +7,5 %] ni de l'intervalle [-15%, +15%]. Ces résultats montrent que la masse moyenne des comprimés testés est conforme à la norme prescrite par la Pharmacopée Européenne (2008).
- Le taux de friabilité est de 0,28%, il est donc conformes à la norme ( $\leq 1\%$ ) exigée par la Pharmacopée Européenne (2008) (tableau VI).
- Le temps de délitement (de désagrégation) de tous les comprimés analysés est conforme à la norme la Pharmacopée Européenne (2008) ( $\leq 15\text{min}$ ).
- Le résultat de dosage de l'acide folique obtenu est de 5,12 mg/cp, On remarque donc la conformité de la dose du principe actif à la norme (4,5 mg/cp à 5,5 mg/cp) selon la Pharmacopée Européenne (2008) (tableau VI).

**Discussion**

L'étude des caractères organoleptiques a les mêmes intérêts que ceux du principe actif.

Pour la masse moyenne et l'uniformité de masse selon **Boudendouna (2010)**, La pharmacopée européenne donne les spécifications en fonction de la masse du comprimé. Les comprimés ayant une masse moyenne entre 80 mg et 250 mg, ont un écart limite de 7.5%.

A partir de cela notre résultats pour la masse moyenne (100,2 mg) et l'uniformité de masse (limite de 7.5%) est conformes à les normes de La Pharmacopée Européenne ce qui indique l'homogénéité des comprimés.

Concernant la friabilité d'après **Boudendouna (2010)**, La perte en masse doit être inférieure à 1%.

Donc notre résultat (0,28%) est inférieur à 1% (donc elle est conforme à la norme), ce faible taux donne une forte sécurité contre les chocs mécaniques au moment du conditionnement, du transport, et de la distribution du médicament.

Le temps de délitement (de désagrégation) témoigne que le désintégrant (amidon de maïs) utilisé est de bonne qualité. On peut dire que ce médicament se délite facilement au niveau de l'œsophage ce qui favorise la dispersion et l'absorption du principe actif.

Le résultat de dosage de l'acide folique prouve d'une part, la bonne maîtrise du processus de fabrication, et d'autre part que la posologie de prescription satisfera aux besoins des patients.

L'ensemble des analyses physico-chimiques va permettre de juger le produit fini Zanitra® 5mg comme étant d'une bonne qualité physicochimique.

## 2. Résultats de contrôle microbiologique du produit fini

Les résultats des analyses microbiologiques réalisées sur trois lots de produit fini sont représentés sur le tableau VII.

**Tableau VII:** Résultats d'analyse microbiologique du produit fini

Tests		Résultats			Norme (PE, 2008) UFC/g	Etat
		Lot n°1	Lot n°2	Lot n°3		
Germes viables	Bactéries	00 UFC/g	00 UFC/g	00 UFC/g	≤5000UFC/g	conforme
	Levures, moisissures	00 UFC/g	00 UFC/g	00 UFC/g	≤500UFC/g	Conforme
Entérobactéries		≤10UFC/g	≤10UFC/g	≤10UFC/g	≤500UFC/g	Conforme
<i>Escherichia coli</i>		Absence	Absence	Absence	Absence	Conforme
Salmonelles		Absence	Absence	Absence		
<i>Staphylococcus aureus</i>		Absence	Absence	Absence		

**Interprétation des résultats :**

D'après le tableau VII :

✓ On constate qu'il y a une absence totale des germes viables (bactéries, levures et moisissures) chez les trois lots étudiés ce résultat est conforme à la norme exigée par la Pharmacopée Européenne (2008),  $\leq 5000$ UFC/g chez les bactéries et  $\leq 500$ UFC/g chez les Levures et moisissures.

✓ La valeur des entérobactéries est inférieure à la norme ( $\leq 500$ UFC/g) de la Pharmacopée Européenne (2008), ce qui indique que leur présence ( $\leq 10$ UFC/g) est non significative.

✓ On constate aussi qu'il y a une absence totale des germes pathogènes (*Escherichia coli*, Salmonelles et *Staphylococcus aureus*) conformément à la norme selon la Pharmacopée Européenne (2008) (tableau VII).

**Discussion**

Les essais décrits pour le contrôle microbiologique des produits non stériles (dénommé aussi « dénombrement des germes aérobies viables totaux » – Monographie 2.6.12 de la Pharmacopée européenne) permettent le dénombrement des bactéries mésophiles, des moisissures et des levures capables de se développer en aérobiose. Ces essais servent avant tout à déterminer si un produit est conforme aux exigences microbiologiques spécifiées de sa monographie (**Roché et Niel, 2006**).

Donc d'après le tableau VII pour les bactéries viables totales ainsi que pour les levures et les moisissures, on remarque l'absence de toutes proliférations microbiennes, ces résultats sont conformes aux exigences microbiologiques décrites par la Pharmacopée Européenne (2008).

Pour les entérobactéries, l'absence de trouble pour les trois lots, indique que le produit fini contient moins de 10 UFC/g, ce qui est conforme à la norme de la Pharmacopée Européenne.

Pour *Escherichia coli*, Salmonelles, *Staphylococcus aureus*, selon **Roché et Niel (2006)**, les essais décrits pour ces micro-organismes sont en règle générale, pour les produits pharmaceutiques et cosmétiques, des tests négatifs. Il ne doit pas être observé de colonies du type décrit.

Donc dans notre étude, on remarque une absence totale de ces germes pathogènes, nos résultats corroborent ceux de **Roché et Niel (2006)**.

Enfin, le fait que le médicament soit sous forme de comprimés anhydres, empêche toute prolifération microbienne.

### 3. Résultats de Contrôle toxicologique du produit fini

Les résultats de contrôle toxicologique du produit fini Zanitra® 5mg réalisées sur les souris albinos sont représenté dans le tableau VIII.

**Tableau VIII** : Résultats de contrôle toxicologique de produit fini Zanitra® 5mg

<b>Test</b>	<b>Résultat</b>	<b>Norme (PE, 2008)</b>	<b>Etat</b>
<b>Toxicité</b>	Absence d'anomalie et de mortalité.	Absence d'anomalie et de mortalité.	conforme

#### Interprétation de résultat

D'après le tableau VIII :

Le test de toxicité de produit fini Zanitra® 5mg qui a été réalisé avec une dose journalière plus élevée (0.25mg) que la dose journalière recommandée chez les souris (0.0016 mg) confirme que ce médicament ne présente aucune mortalité chez les animaux pour une période de 48 heures.

#### Discussion

L'absence de mortalité ainsi que l'état normal des souris indique qu'il n'existe pas d'impuretés dans la matière première ni d'addition accidentelle ou criminelle d'un autre principe actif ou d'un élément toxique. Cela témoigne que les conditions de fabrication ont été strictement respectées permettant ainsi d'obtenir un produit fini satisfaisant et conforme aux normes préconisées par la Pharmacopée Européenne(2008).

*Conclusion*

## Conclusion

Notre travail à l'unité BIOTIC de Gué de Constantine du groupe SAIDAL, nous a permis de faire une mise au point sur les techniques indispensables dans le contrôle de qualité physico-chimique, microbiologique, et toxicologique des médicaments, en particulier, un médicament non obligatoirement stérile Zanitra® 5mg.

La bonne qualité physicochimique du principe actif (acide folique) et de l'excipient (Amidon de Mais), qui se traduit par les résultats obtenus conformément aux normes de la pharmacopée européenne 2008 indique la bonne qualité de produit, alors que celle du produit fini prouve la maîtrise des processus de fabrication.

Concernant la bonne qualité microbiologique du produit fini, elle est traduite par l'absence des bactéries et germes viables ainsi que les bactéries pathogènes, ce qui représente les bonnes conditions d'hygiène.

Le contrôle toxicologique n'a prouvé aucune éventuelle toxicité due aux substances ajoutées accidentellement pendant la fabrication, elle est traduite par l'absence des mortalités au niveau des souris étudiées pour une période de 48 heures.

Tous les résultats des contrôles effectués permettent de conclure que le produit peut être délivré aux patients sans aucun risque.

*Références*  
*Bibliographiques*

## Références Bibliographiques

**Aiache J. M., Beyssac E., Cardot J.M., Hoffart V. et Renoux R., 2008-** Initiation à la connaissance du médicament. 5<sup>ème</sup> Edition Elsevier Masson SAS., 413p.

**Allo O., Blanc P. et Dalmasso M.A., 2005-** Pharmacie Galénique BP. 2<sup>ème</sup> Edition Groupe liaisons SA., 127p.

**Altavilla A., 2012-** La recherche sur les cellules souches, quels enjeux pour l'Europe ?. L'Harmattan., 673p.

**Aveline L., Cartier O., Cuer P., Daucé P., March C., Désévéday E., Dovillez P., Duchet N., Griveau B., Grosshans C., Guichon M., Jochum C., Joubert A., Le Clainche M., Laroque G., Legrain J., Mallay D., Manicot C., Masson-Mosca M.A., Lemaire-Ngunuu C., Novella J.L., Ruillon D. et Vincens A., 2000-** Gériatrie. ESTEM., 359p.

**Ayadim M. et Habib J.L., 2013-** chimie générale. Presses universitaires de Louvain.,373p.

**Baxerres C., 2013-** Du médicament informel au médicament libéralisé, une anthropologie du médicament pharmaceutique au Bénin. Editions des archives contemporaines, Paris., 315p.

**Beaudeau J.L. et Durand G., 2008-** Biochimie médicale, Marqueurs actuels et perspectives. 2<sup>ème</sup> Edition Lavoisier., 601p.

**Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G. et Verne-Bourdais E., 2002-** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Edition Doin., 248p.

**Boudendouna A.H.,2010-** Méthodologie de la formulation d'une forme orale solide à libération prolongée. Institut National Polytechnique de Toulouse, France. Thèse doctorat. PP81- 82.

**Branger A., Richer M.M. et Roustel S., 2007a-** Alimentation et processus technologiques. Educagri éditions, Dijon., 295p.

**Branger A., Richer M.M. et Roustel S., 2007b-** Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Educagri éditions, Dijon., 205p.

**Briandet R., Fechner L., Naitali M. et Dreanno C., 2012-** Biofilms, quand les microbes s'organisent. Editions Quae, France., 173p.

**Cano N., Barnoud D., Schneider S., Vasson M.P., Hasselmann M. et Leverve X., 2007-** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 3<sup>ème</sup> Edition Springer- Verlag France., 1177p.

**Charreau V., Etienne N. et Ingargiola E., 2006-** à la découverte des aliments. Educagri éditions, Dijon., 352p.

**Chegrani-Conan C., 2010-** La santé du cerveau est dans l'assiette. Editions Eyrolles, Paris., 191p.

**Claverie I. et Hedde H., 2008-** Pharmacologie générale et toxicologie, mécanismes fondamentaux. 2<sup>ème</sup> Edition Wolters Kluwer France., 99p.

**Courtot D. et Jaussaud P., 1990-** le contrôle antidopage chez le cheval. Edition INRA, Paris., 155p.

**Danel V. et Barriot P., 1999-** Intoxications aiguës en réanimation. 2<sup>ème</sup> Edition Arnette, France., 611p.

**Darmon M. et Darmon N., 2008-** L'équilibre nutritionnel. Edition Lavoisier., 289p.

**Delarras C., 2010-** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. 2<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, Paris., 525p.

**Delarras C., 2014-** pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier, Paris., 757p.

**Depovere P., 2005-** chimie organique. 2<sup>ème</sup> Edition De Boeck et Larcier SA., 115p.

**Dessaigne A., 2004-** Maîtrisez la fiche posologique d'un médicament. Editions heures de France., 71p.

**Dictionnaire SAIDAL 2005.**

**Dromigny E., 2012-** Les critères microbiologiques des denrées alimentaires. Edition Lavoisier, Paris., 495p.

**Ferland G., 2003-** Alimentation et vieillissement. Les Presses de L'Université de Montréal., 347p.

**Fonteneau J.M. et Klusiewicz P., 2008-** Cahiers du préparateur en pharmacie, Travaux pratiques de préparation et de conditionnement des médicaments. Edition Wolters Kluwer, France., 264p.

**Frénot M. et Vierling E., 2001-** Biochimie des aliments Diététique du sujet bien portant. 2<sup>ème</sup> Edition Doin éditeurs., 301p.

**Gazengel J.M. et Orecchioni A.M., 2013-** le préparateur en pharmacie. 2<sup>ème</sup> Edition Lavoisier., 1727p.

**Gentilini M., Caumes E., Danis M., Richard-Lenoble D., Bégué P., Touze J.E. et Kerouédan D., 2012-** Médecine Tropicale. 6<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, Paris., 1279p.

**Goetz-Lopes V., 2007-** industrie pharmaceutique, logistique de distribution. Techniques de l'Ingénieur., AG 5 435-2.

**Guénard H., 2001-** Physiologie humaine. 3<sup>ème</sup> Edition Pradel., 599p.

**Guillarme D., 2014-** Evolutions majeures en chromatographie liquide. Techniques de l'Ingénieur., 1 494-1.

**Hulse J.H., 2008-** Développement durable, un avenir incertain. Les Presses de l'Université Laval., 379p.

**Jawetz E., Melnick J.L. et Adelberg E.A., 1973-** Microbiologie médicale. Les Presses de l'Université Laval., 605p.

**Kaloustian J. et Hadji Minaglou F., 2012-** La connaissance des huiles essentielles, qualilogie et aromathérapie. Springer-Verlag France., 210 p.

**Khaber Azi M., 2011-** Développement pharmaceutique de formes à libération prolongée de tramadol à base de matrice hydrophile, Hydroxy Propyl Methyl Cellulose et Gomme Guar. Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie. Mémoire de Magister. PP 113.

**Kirkiacharian S., 2007-** Chimie médicinale, Structure et activité du médicament. Techniques de l'Ingénieur, 3 280-23.

**Landry Y., 2013-** Initiation à la connaissance du médicament-UE6. Edition Dunod, Paris., 299 p.

- Latham M.C., 2001-** La Nutrition Dans Les Pays en Développement. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture., 505p.
- Léonard L. et Ben Amar M., 2002-** Les psychotropes, pharmacologie et toxicomanie. Les Presses de L'Université de Montréal., 881p.
- Leverve X., Cosnes J., Erny P. et Hasselmann M., 2001-**Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 2<sup>ème</sup> Edition Springer- Verlag France.,947p.
- Lévy-Dutel L. et Scotto E., 2011-** Vivre heureux et centenaire. Groupe Eyrolles., 110p.
- Marolla M., Lefrère F. et Traineau R., 2008-** Hématologie, transfusion sanguine et soins infirmiers. 4<sup>ème</sup> Edition Wolters Kluwer France., 198p.
- Mathieu M.J. et Fonteneau J.M., 2008-** le manuel porphyre du préparateur en pharmacie. Wolters Kluwer France., 1409p.
- Mehta A.B. et Hoffbrand A.V., 2003-** Hématologie. De Boeck Diffusion SA., 197p.
- Page C.P., Curtis M.J., Sutter M.C., Walker M.J. et Hoffman B.B., 1999-** Pharmacologie intégrée. De Boeck Université SA., 585p.
- Patrick G. L., 2002-** chimie pharmaceutique. De Boeck., 601p.
- Pebret F., 2005-** Dictionnaire de pharmacologie générale suivi de Dictionnaire de statistique médicale. Heures de France.,83p.
- Pharmacopée Européenne, 2008 :** 6<sup>ème</sup> édition.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Willey J.M., Sherwood L.M. et Woolverton C.J., 2010-** Microbiologie. 3<sup>ème</sup> Edition De Boeck SA., 1086p.
- Rabasso N., 2006-** chimie organique, généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques. De Boeck et Larcier SA., 345p.
- Raiffaud C., 2001-** Produits « bio » De quelle qualité parle-t-on ?. Educagri éditions., 183p.
- Roché Y. et Niel P., 2006-** Analyses en microbiologie- produits non stériles. Techniques de l'Ingénieur., 3 352-2 – 3 352-5.
- Stora D., 2010-** pharmacologie BP, Classes pharmacologiques. 4<sup>ème</sup> Edition Wolters Kluwer France., 415p.

**Stora D., 2008-** Pharmacie et surveillance infirmière. 5<sup>ème</sup> Edition Wolters Kluwer France., 372p.

**Talbert M., Willoquet G. et Gervais R., 2009-** Le guide pharmaco clinique. Wolters Kluwer France., 1043p.

**Vandamme T. F., Rival Y., Pabst J. Y. et Heitz C., 2010-** Initiation à la connaissance du médicament. Lavoisier., 335p.

**Vaubourdolle M ., 2007-** Médicaments. 3<sup>ème</sup> édition Wolters Kluwer SA. Tome 4 , 855p.

**Vidailhet M., Bocquet A., Bresson J. L., Briend A., Chouraqui J. P., Dupont C., Darmaun D., Frelut M. L., Ghisolfi J., Girardet J.-P., Goulet O., Putet G., Rieu D., Rigo J. et Turck D., 2008-** Prévention par l'acide folique des défauts de fermeture du tube neural, la question n'est toujours pas réglée. Edition Elsevier Masson SAS, 15 : 1224.

# *Annexes*

## ANNEXE I

### Matériels non biologique

1-Matériel utilisé pour le contrôle physicochimique:

**Tableau :** Matériels et réactifs utilisé pour le contrôle physicochimique

Appareils	Réactifs	Verrerie
- Agitateur magnétique. -Appareil de mesure du temps de délitement des comprimés. -Balance précise. - Dessiccateur. - Etuve de paillasse. - Friabilimètre ERWEKATA -Four à moufle. - Lampe à UV. - Hotte chimique aspirante. -Minéralisateur. - Spectrophotomètre UV-visible. - Polarimètre. -pH mètre -HPLC Model (WATERS).	- Acide chlorhydrique dilué (1/10). - Acide sulfurique. - Ammoniaque. - Ethanol à 96%. - Hydroxyde de Sodium 0,1 M - Phosphate dipotassique à 5,5 g/l. Phosphate monopotassique à 11,16g/l. - Alcool 96 % - Solution de Carbonate de sodium à 28,6 g/l. -Acide thioglycolique. -Solution à lppm de Fer. - Solution d'iode. -méthanol. -NaOH 0.1N.	- Micropipette. - Poire. -Portoirs. -Tubes à essais. - Pipettes en verre graduées (10ml.20ml et 25ml). - Fioles jaugées en verre (50ml et 100ml 150ml). - Erlenmeyers. - Bêcher. - Burette. - Creuset. -Entonnoir en verre et en plastique. -Eprouvette en verre gradué. -Cuve pour CCM. -Gants. -Papiers filtres. -Papier en aluminium. -Spatule en inox.

## 2- Appareillage et matériel utilisés pour le contrôle microbiologique :

-Pipettes graduées stériles.

-Tubes à essais.

-Bec benzène.

-Etuve réglée à 37°C Model(MEMMERT).

-Etuve réglée à 44°C Model(MEMMERT).

-Etuve réglée à 25°C Model(MEMMERT).

-Four de stérilisation 180°.

## 3- Appareillage et matériel utilisés pour le contrôle toxicologique :

-Mortier

-Sonde à gavage gastrique

-Seringue 2 ml, pince

-Balance de précision

-Gant a usage unique

## ANNEXE II

### Matériel (photos personnel)



pH- mètre



Balance de précision



Balance de pesée analytique



Dessiccateur



Polarimètre



Friabilimètre



Appareil de délitement



Four à moufle



Agitateur de tube



chromatographie liquide haute performance(HPLC)

## ANNEXE III

### COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Bouillon au Tétrathionate-bile-vert-brillant (TBG) :

Peptone.....	8,6g
Bile de bœuf séché.....	08g
Chlorure de sodium.....	6,4g
Carbonate de calcium.....	20g
Tétrathionate de potassium.....	20g
Eau distillée.....	1000ml
Vert brillant.....	0,07g

pH =  $7,0 \pm 0,2$

Bouillon lactose :

Extrait de viande de bœuf.....	3g
Hydrolysate pancréatique de gélatine.....	5g
D-Lactose.....	5g
Eau distillée.....	1000ml

pH=  $6,9 \pm 0,2$

Bouillon Mossel :

Hydrolysate pancréatique de gélatine.....	10g
Glucose monohydraté.....	5g
Bile de bœuf déshydraté.....	20g
Phosphate monopotassique.....	2g
Phosphate disodique.....	6,45g
Vert brillant.....	15mg
Eau purifiée.....	1000ml

pH= $7,2 \pm 0,2$ .

### Gélose de Mac Conkey :

Agar.....	13,5g
Peptone de caséine.....	17g
Peptone de viande.....	17g
Chlorure de sodium.....	5g
Sels biliaire .....	1,5g
Lactose.....	10g
Rouge neutre.....	0,03g
Violet cristallisé.....	0,001g
Eau purifiée.....	1000ml
pH=7,1±0,2	

### Gélose Sabouraud -glucosé-gélosé :

Peptones de viande et de caséine.....	10g
Glucose monohydrate.....	40g
Gélose.....	15g
Eau distillé.....	1000ml
pH = 5,6 ± 0,2	

### Gélose vert brillant-rouge de phénol-lactose-saccharose (PBLS) :

Peptone de viande et de caséine.....	10g
Extrait de levure.....	3 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Lactose .....	10g
Saccharose.....	10g
agar.....	12g
Rouge de phénol.....	0.08g
Vert brillant.....	0,0125g
Eau purifiée.....	1000ml
pH=6,9 ± 0,2	

Gélose Vogel - Johnson :

Tryptone .....	10g
Extrait de levure.....	5g
Mannitol.....	10g
Phosphate di potassique.....	5g
Chlorure de lithium.....	5g
Glycine.....	10g
Rouge de phénol.....	0,025g
Agar.....	16g
Eau distillé.....	1000ml

pH =7,1 ± 0,2

Milieu gélose aux peptones de caséine et de soja :

Peptone pancréatique de caséine.....	15g
Peptone papainique de soja.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée .....	1000ml
Gélose.....	15g

pH =7,3 ± 0,2

Solution tampon peptonée au chlorure de sodium à pH=7:

Phosphate mono-potassique.....	3,6g
Phosphate disodique dihydraté.....	7,2g
Peptone de caséine ou de viande .....	1g
Chlorure de sodium.....	4,3g
Eau distillé.....	1000ml

## ANNEXE IV

### Contrôle physico-chimique du principe actif (AF)

Pouvoir rotatoire spécifique

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \times V}{Pe \times l} \times \frac{100}{(100 - Te)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{0.19 \times 25}{0.25} \times \frac{100}{(100 - 7.62)} = 20,52$$

### Dosage de l'acide folique par HPLC

Détermination du taux des cendres sulfuriques

$$CS (\%) = \frac{Pf - Pv}{Pe} \times 100$$

$$Pv = 21,1624$$

$$Pf = 21,1637$$

$$Pe = 1,001$$

$$CS (\%) = \frac{21,1637 - 21,1624}{1,001} \times 100 = 0,12 \%$$

### Contrôle physico-chimique de l'amidon de maïs

La perte à la dessiccation

$$P\% = [(Pv + Pe) - Pf] / Pe \times 100$$

$$P\% = [(51,1985 + 1,0081) - 52,1073] / 1,0081 \times 100$$

$$P\% = 9,85 \%$$

Détermination du taux des cendres sulfuriques

$$CS (\%) = \frac{Pf - Pv}{Pe} \times 100$$

$$Pv = 21,4983$$

$$Pf = 21,4990$$

$$Pe = 1,0006$$

$$CS (\%) = \frac{21,4990 - 21,4983}{1,0006} \times 100 = 0,06 \%$$

## Contrôle physico-chimique du produit fini

Poids moyen (mg)

$P_m = (\text{Poids des 10 comprimés})/10$

$P_m = 1000,2/10 \quad P_m = 100,2 \text{ mg}$

Friabilité

$$F = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

$$F = \frac{6,5544 - 6,5355}{6,5544} \times 100$$

$F = 0,28\%$

Uniformité de masse

**Tableau :** Les masses individuelles de 20 comprimés

<b>Cp1</b>	<b>Cp2</b>	<b>Cp3</b>	<b>Cp4</b>	<b>Cp5</b>
0,10448 g	0,10209 g	0,10112 g	0,1039 g	0,10127 g
<b>Cp6</b>	<b>Cp7</b>	<b>Cp8</b>	<b>Cp9</b>	<b>Cp10</b>
0,10244 g	0,10449 g	0,09603 g	0,10019 g	0,10084 g
<b>Cp11</b>	<b>Cp12</b>	<b>Cp13</b>	<b>Cp14</b>	<b>Cp15</b>
0,10455 g	0,10197 g	0,10154 g	0,0982 g	0,10234 g
<b>Cp16</b>	<b>Cp17</b>	<b>Cp18</b>	<b>Cp19</b>	<b>Cp20</b>
0,10388 g	0,10419 g	0,10229 g	0,10384 g	0,102012 g

Uniformité de masse = [poids moyen – 7,5% ; poids moyen + 7,5%]

Uniformité de masse = [0,092685 - 0,107715]

Identification de l'acide folique

$$2,8 \leq \frac{A_{256}}{A_{365}} \leq 3 \quad \text{donc :} \quad 2,8 \leq \frac{0,551}{0,186} = 2,9 \leq 3$$

Dosage de l'acide folique

$$\frac{\text{DO essai}}{\text{DO étalon}} \times \frac{\text{PE étalon}}{\text{PE essai}} \times \frac{\text{PM}}{10}$$

$$\frac{0,551}{0,537} \times \frac{100,4}{201} \times \frac{100,2}{10} = 5,12 \text{ mg/cp.}$$