

**Année 2021**

**N°: MS 1912021**

**Mémoire de fin d'études**

Pour L'obtention du Diplôme National de Spécialité  
en : « Pharmacie industrielle »

**Intitulé**

Etude de stabilité et dosage des produits de dégradation de  
l'Amoxicilline par chromatographie liquide à haute  
performance dans une forme pharmaceutique Orale

Présenté par :  
**Docteur Houda ATTJIOUI**

Sous la direction du  
**Professeur Mustapha Bouatia**

---

# REMERCIEMENTS

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance  
A notre directeur de diplôme de spécialité, et à  
tous les professeurs qui nous ont enseignés et  
encadrés de près, pour leurs multiples conseils et  
pour toutes les heures consacrées à diriger nos  
travaux et apporter des remarques et suggestions  
pertinentes à notre formation, pour nous offrir une  
spécialité complète et d'une qualité digne d'un  
pharmacien spécialiste en industrie  
pharmaceutique*

*Je tiens à remercier particulièrement mon  
encadrant Pr Bouatia Mustapha pour sa confiance,  
sa grande disponibilité et son soutien tout au long  
de mon stage et la réalisation de ce travail.*

*A tous mes maitres de stages, et tous les  
intervenants qui ont contribué à la  
réalisation de ce travail, je présente mes  
remerciements, mon respect et ma  
gratitude*

## Table des matières

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>7</b>
<b>2. MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>8</b>
2.1. Démarche de l'étude.....	8
2.2. Spécifications des produits de dégradation dans les produits finis .....	10
2.3. Equipement.....	11
2.4. Réactifs et solutions .....	11
2.5. Conditions Chromatographiques .....	11
2.6. Préparation des solutions.....	12
2.7. Préparation des échantillons.....	12
2.7.1. Préparation des échantillons non dégradés pour le test de stress.....	12
2.7.2. Préparation des échantillons dégradés pour le test de stress.....	13
2.7.3. Préparation des échantillons pour le test de validation analytique .....	13
2.8. Paramètres de validation .....	14
2.9. Formule de calcul .....	14
<b>3. RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>15</b>
Partie 1. Test de stress .....	15
1. Conditions de dégradation.....	15
2. Résultats du test de stress.....	15
3. Discussion des résultats du test de stress .....	17
Partie 2. Validation de la méthode du dosage des produits de dégradation de l'amoxicilline par HPLC	19
1. Spécificité .....	19
2. Linéarité.....	22
3. Exactitude.....	28
4. Fidélité.....	32
4.1. Répétabilité.....	33
4.2. Fidélité intermédiaire .....	33
5. Limite de détection et limite de quantification.....	38
6. Stabilité de la solution standard .....	39
7. Robustesse .....	39
<b>4. CONCLUSION</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>41</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>42</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

---

CTD	: Dossier technique commun
FDA	: Food and drug administration
ICH	: International Conference on Harmonisation
BPF	: Bonnes pratiques de fabrication
HPLC	: Chromatographie liquide haute performance
CV	: Coefficient de variance
RRF	: Facteur de réponse relatif
SA	: Substance active
LD	: Limité de détection
LQ	: Limite de quantification
PF	: Produit fini
UV	: Ultra-violet
ODS	: Octadécylsilyle
MP	: Matière première
TR	: Temps de rétention
PDA	: Détecteur à barrette de diodes
DMF	: Drug master file
ND	: Non détectée
RRT	: Temps de rétention relatif
RSD	: Relative standard deviation
STD	: Standard

## LISTE DES TABLEAUX

---

- Tableau I. Démarche de l'étude de stabilité et de la validation analytique
- Tableau II. Spécifications des produits de dégradation dans les produits finis
- Tableau III. Seuil de déclaration pour les produits de dégradation dans les produits finis
- Tableau IV. Conditions chromatographiques
- Tableau V. Gradient d'élution
- Tableau VI. Paramètres de validation vérifiés
- Tableau VII. Conditions de stress pour le test de stress de l'amoxicilline
- Tableau VIII. Conditions d'étude de stress et les résultats obtenus sur les % de dégradation
- Tableau IX. Résultats des aires de l'amoxicilline et des impuretés obtenus de chaque condition de stress
- Tableau X. Résultats des pourcentages de l'amoxicilline et des impuretés obtenus de chaque
- Tableau XI. Temps de rétention des impuretés connus
- Tableau XII. Temps de rétention des excipients
- Tableau XIII. Temps de rétention des impuretés dans l'essai dopé
- Tableau XIV. Tableau récapitulatif des résultats de spécificité et critères d'acceptation
- Tableau XV. Temps de Rétention Relatif de l'amoxicilline et les impuretés
- Tableau XVI. Résultats des aires du standard d'amoxicilline
- Tableau XVII. Statistiques de la régression linéaire du standard d'amoxicilline
- Tableau XVIII. Analyse de variance du test de linéarité du standard
- Tableau XIX. Résultats des aires des impuretés de dégradation
- Tableau XX. Statistiques de la régression linéaire des impuretés
- Tableau XXI. Analyse de variance du test de linéarité des impuretés
- Tableau XXII. Récapitulatif des résultats de linéarité
- Tableau XXIII. Résultats d'exactitude du dosage des impuretés
- Tableau XXIV. Résultats du test de répétabilité des impuretés
- Tableau XXV. Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté C
- Tableau XXVI. Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté D ( $\alpha$ )
- Tableau XXVII. Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté D ( $\beta$ )
- Tableau XXVIII. Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté E (isomère 1)
- Tableau XXIX. Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté E (isomère 2)
- Tableau XXX. Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté F
- Tableau XXXI. Récapitulatif des CV des impuretés
- Tableau XXXII. Limite de détection et limite de quantification de l'amoxicilline et ses impuretés
- Tableau XXXIII. Résultat de la stabilité du standard d'amoxicilline
- Tableau XXXIV. Vérification des paramètres du système de suitability après changement de débit
- Tableau XXXV. Evaluation de l'impact du changement sur l'analyse à un débit  $\pm 10\%$
- Tableau XXXVI. Vérification des paramètres du système de suitability après changement de température
- Tableau XXXVII. Evaluation de l'impact du changement sur l'analyse à une température  $\pm 10\%$

## **LISTE DES FIGURES**

---

Figure 1. Courbe de régression linéaire du standard d'amoxicilline

Figure 2. Graphe des résidus de la linéarité du standard d'amoxicilline

Figure 3. Courbe de régression linéaire des impuretés

Figure 4. Graphe des résidus de la linéarité des impuretés

# 1. INTRODUCTION

---

La stabilité d'une forme pharmaceutique est sa capacité à demeurer conforme aux critères d'acceptation assurant son identité, son titre, sa qualité et sa pureté durant une période de conservation spécifiée [1]. Elle dépend à la fois des conditions de leur stockage et des caractéristiques intrinsèques du produit (substance active, nature des excipients, interaction substance active/Excipients, qualité de la formulation, interaction contenant/contenu) [2].

L'instabilité d'un produit pharmaceutique peut se traduire soit par la formation d'impuretés pouvant éventuellement présenter une certaine toxicité ou par une diminution de la teneur en principe actif dans le médicament, soit aux aspects liés aux caractéristiques microbiologiques.[3]

Les tests de stress sont l'outil majeur à utiliser dans les buts de prévenir les problèmes de stabilité et d'identifier les produits et les schémas de dégradation au sein des produits pharmaceutiques [4]. Ainsi, de fournir des informations importantes pour le développement de formulations plus stable et qui garantissent plus d'innocuité, de qualité et d'efficacité pour le patient.

Grace aux efforts de la conférence internationale sur l'harmonisation, des exigences réglementaires de plus en plus poussées en ce qui concerne la stabilité et l'identification des impuretés et produits de dégradation à des taux spécifiés ont été publiées.[5][6][7][8]

Cependant, le développement et la validation des méthodes analytiques pour la recherche et contrôle de ces impuretés sont devenues un concept de base dans les laboratoires de contrôle qualité des médicaments. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que leurs produits sont stables tout au long du cycle de leur vie , que les impuretés contenues dans leurs produits sont à des taux minimes acceptables et que les méthodes d'analyses employées pour le contrôle de leurs produits sont parfaitement valides et fiables.[9]

La validation analytique appartient au module 3 du dossier CTD d'autorisation de mise sur le marché d'un produit pharmaceutique, dictée par des exigences scientifiques et réglementaires (directives européennes, FDA, ICH, BPF...), Elle constitue généralement l'étape terminale dans le développement d'une nouvelle méthode analytique. Elle doit permettre d'évaluer les performances de la méthode, dans des conditions analytiques préalablement déterminées, par l'étude d'un certain nombre de paramètres communément appelés « critères de validation » au moyen d'outils statistiques appropriés.

La validation analytique s'applique aux différentes méthodes de contrôle, y compris le développement galénique, le contrôle de la matière première, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et aussi pour les études de stabilité.

De nouvelles méthodes chromatographiques indiquant la stabilité ont été développées pour l'estimation du dosage et des impuretés de l'amoxicilline pour l'évaluation de la qualité pharmaceutique [10].

C'est dans ce contexte que se situe le présent travail pour étudier le comportement d'une molécule chimique, à l'état de matière première et à l'état de produit fini, sous l'effet de différents types de stress (hydrolyse acide, neutre et basique, dégradation oxydative, thermolyse) et ensuite de décrire les modalités de validation analytique de la méthode de recherche des produits de dégradation de cette molécule dans une poudre pour suspension buvable par méthode chromatographique (HPLC).

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Démarche de l'étude**

Le déroulement du travail a été réparti en deux parties, une partie pour le test de stress afin de déterminer les produits de dégradation de la molécule et par conséquent ses voies de dégradation, et une deuxième partie pour la validation de la méthode de recherche de ces impuretés par méthode HPLC .

La démarche de l'étude de dégradation forcée et de la validation analytique de la méthode d'analyse ainsi que les normes requises pour chaque paramètre sont décrits dans le tableau ci-dessous :

**Tableau I . Démarche de l'étude de stabilité et de la validation analytique**

Paramètre	Principe	Normes
<b>PARTIE 1. DEGRADATION FORCEE</b>		
<b>Test de stress</b>	L'étude de la dégradation forcée portera sur des solutions stressées de la substance active et de l'essai par un acide fort, une base forte, un oxydant et par la chaleur. Ce test permet de déterminer les impuretés inconnues en comparant les différents chromatogrammes à ceux des solutions témoins non stressées. [11-12]	Détermination du % de dégradation et des impuretés apparues.  Pureté des pics.
<b>PARTIE 2. VALIDATION DE LA METHODE DU DOSAGE DES PRODUITS DE DEGRADATION DE L'AMOXICILLINE PAR HPLC</b>		
<b>Spécificité</b>	La spécificité de la méthode, consiste en une injection de chacune des solutions ci-dessous [13] <ul style="list-style-type: none"> <li>- Blanc</li> <li>- Standard d'Amoxicilline</li> <li>- Solution du mélange d'impuretés</li> <li>- Solution du mélange de placebo</li> <li>- Solutions essais</li> <li>- Solutions de l'essai dopé des impuretés</li> </ul> Détermination du temps de rétention relatif.	Absence d'interférence entre les pics des chromatogrammes dublanc, des excipients, et d'autres impuretés ou d'autres produits de dégradation présentes dans la matrice de l'échantillon.
<b>Linéarité</b>	L'étude de la linéarité du dosage des impuretés de dégradation est évaluée pour chacun des niveaux (5, 50,100,120,150) correspondant à des concentrations équivalentes à 0,05%, 0,5%, 1%, 1,2% et 1,5% de la concentration des impuretés à la limite de spécification. [13]	Déterminer le coefficient de corrélation, le point d'interception sur l'axe des ordonnées (y), la pente de la courbe de régression, ainsi que la somme des carrés des résidus. Un graphique représentant les données doit être inclus.  Coefficient de corrélation $\geq 0,990$ Signification pratique de l'ordonnée à l'origine $\leq 20 \%$ .
<b>Exactitude</b>	L'étude de l'exactitude s'effectue à 3 niveaux ( <b>5, 100 et 150</b> ) des concentrations équivalentes à 0,05%, 1 % et 1,5% du domaine d'utilisation de la méthode [13]  Il est également nécessaire d'ajouter un niveau 0 d'une concentration équivalente à 0% en impuretés afin d'évaluer la quantité d'impuretés ramenée par la matrice.	Le pourcentage de recouvrement pour tous les échantillons doit être compris entre 80 et 120%. Le CV% des pourcentages de recouvrement doit être $\leq 20 \%$ .
<b>Répétabilité</b>	Préparer et injecter 6 solutions indépendantes Calcul de la teneur individuelle en SA de chaque solution et la teneur moyenne Calcul de CV pour les six préparations	Le CV des six prises d'échantillons préparés indépendamment doit être $\leq 20\%$ .

<b>Fidélité intermédiaire</b>	<p>Le test de fidélité est réalisé sur un homogène des impuretés auquel est <del>ajouté une quantité constante</del> de la forme reconstituée à 100%.</p> <p>Réaliser le test de <u>répétabilité</u> sur 6 prises d'essai indépendantes. Réaliser 2 séries supplémentaires d'analyse sur 6 prises d'essai indépendantes pour la fidélité intermédiaire [13]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La première série supplémentaire sera réalisée dans le même jour (jour 1) par un deuxième analyste (analyste 2) sur des équipements différents en utilisant des phases mobiles et/ou colonnes différentes.</li> <li>- la deuxième série supplémentaire sera réalisée dans un jour différent (jour 2) par le même analyste (analyste 1 ou analyste 2).</li> </ul>	<p>Le CV de chacune des séries prises indépendamment doit être <math>\leq 20\%</math>.</p> <p>Le CV de la répétabilité et la répétabilité moyenne doivent être <math>\leq 20\%</math>.</p>
<b>LD et LQ des impuretés</b>	Le calcul des limites LD et LQ est déterminé par l'approche du rapport signal/bruit. [13]	La LD et LQ calculée doit être inférieure ou égale au seuil de déclaration ( $\leq 0,05\%$ ).
<b>Stabilité de la solution</b>	Evaluer la stabilité des solutions standards à une T° de 4°C pendant 12 heures, 18 heures et 24 heures.	$98,0\% \leq \% \text{ valeur initiale} \leq 102,0\%$
<b>Robustesse</b>	<p>Evaluer la robustesse de la méthode en termes des changements suivants [13]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- débit de la pompe (<math>\pm 10\%</math> du débit déterminé) :</li> <li>- température colonne (<math>\pm 10\%</math> de la température déterminée)</li> </ul>	<p><u>Evaluation qualitative de l'impact du changement sur l'analyse :</u></p> <p>Vérification des paramètres du système de suitability : Facteur de symétrie, Nombre de plateaux théoriques, Résolution, Temps de rétention.</p> <p><u>Pour les impuretés dans les essais :</u></p> <p><math>\pm 0,05\%</math> absolue pour les pics <math>&lt; 0,25\%</math></p> <p><math>\pm 20\%</math> relative pour les pics <math>0,25\% - 0,50\%</math></p> <p><math>\pm 0,10\%</math> absolue pour les pics <math>&gt; 0,50\%</math> à <math>1,0\%</math></p> <p><math>\pm 10\%</math> relative pour les pics <math>&gt; 1,0\%</math></p>

## 2.2. Spécifications des produits de dégradation dans les produits finis

**Tableau II.** Spécifications des produits de dégradation dans les produits finis

Détermination	Normes	
	A libération	A péremption
Impuretés totales	$\leq 4.0\%$	$\leq 5.0\%$
Impureté D	$\leq 1.2\%$	$\leq 1.0\%$
Toute autre impureté identifiée	$\leq 1.0\%$	$\leq 1.0\%$
Toute autre impureté non identifiée	$\leq 0.3\%$	$\leq 0.5\%$

## Seuil de déclaration pour les produits de dégradation dans les produits finis

**Tableau III.** Seuil de déclaration pour les produits de dégradation dans les produits finis

Dose journalière maximale	Seuil de report pour les PF	Référence
≤ 1g	0.1%	ICH Q3B (R) [14]
> 1g	0.05%	

### 2.2. Equipement

L'équipement utilisé est une chaîne chromatographie liquide haute performance (HPLC) de marque Agilent qualifié avec un détecteur UV, et un logiciel gestionnaire de données Empower 3.0 .

### 2.3. Réactifs et solutions

- Eau purifié (grade Milli-Q)
- Sodium hydrogénophosphate (grade AR),
- Méthanol (grade HPLC)
- Acide chlorhydrique 0.5 M et 1M
- Hydroxyde de sodium 0.5 M et 1M
- Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3%
- Acide phosphorique dilué.

### 2.4. Conditions Chromatographiques

**Tableau IV.** Conditions chromatographiques

Filtres	Membranes en esters de cellulose 0,45µm	
Colonne HPLC	Type	Spherisorb ODS2 50 x 4,6 mm, 3 µm
	Température	21°C
	Colonne de garde	ODS2 3µm, 4 x 3,0 mm
Température de la chambre d'échantillonnage	4°C	
Débit de la pompe	1,4 mL/min	
Eluant	Gradient d'élution	
	Voie A : Tampon phosphate 0,05M	
	Voie B : Méthanol HPLC	
	Voie C et D : Eau R	
Volume injecté	10 µL	
Temps d'analyse	25 min	
Détecteur	Type	UV
	Longueur d'onde	230 nm

## Programme de gradient

**Tableau V. Gradient d'élution**

Temps (min)	Tampon phosphate 0,05M (%)	Méthanol (%)
0	100	0
13	73	27
18	73	27
19	100	0
24	100	0

### **2.5. Préparation des solutions**

- ❖ Solution tampon phosphate 0.05 M à pH 4,17 : dans une fiole jaugée de 5000 ml, dissoudre dans l'eau 30.0 g de sodium hydrogénophosphate et porter au volume avec le même solvant. Ajuster le pH à 4,17 à l'aide d'acide phosphorique dilué. Filtrer sur filtre de porosité 0.45 µm.
- ❖ Préparation du standard d'Amoxicilline : dans une fiole jaugée de 500 ml, introduire une quantité exactement pesée de 25 mg d'amoxicilline base à 100%. Compléter au volume avec l'eau purifiée et agiter pendant 45 min à l'aide d'un agitateur magnétique puis filtrer.
- ❖ Préparation des solutions mères des impuretés : Pour chaque impureté, peser individuellement une quantité de 20 mg de l'impureté et l'introduire dans des fioles jaugées de 200 ml, compléter au volume avec l'eau purifiée puis agiter jusqu'à dissolution.
- ❖ Solution test du mélange d'impuretés : Réaliser un mélange d'impureté en prélevant 5 mL de chaque solution mère d'impureté dans une fiole de 200,00 ml, compléter avec de l'eau R.
- ❖ Préparation de la solution du système de suitability : Dans une fiole de 50,0mL, introduire environ 2,5mg de standard d'amoxicilline .Compléter la fiole avec la solution test d'impuretés.

## 2.6. Préparation des échantillons

### 2.6.1. Préparation des échantillons non dégradés pour le test de stress

- ❖ Préparation de la solution d'amoxicilline (MP) non stressée: Peser exactement environ 50 mg d'amoxicilline pour un titre de 100% dans une fiole jaugée de 50 mL. Compléter au volume avec l'eau purifiée et agiter pendant 45 min à 1 heure à l'aide d'un agitateur magnétique. Injecter.
- ❖ Préparation de la solution pour l'essai non stressé: Peser et introduire 41 mg prise d'essai de l'échantillon du produit fini dans une fiole jaugée de 50 mL. Compléter au volume avec l'eau purifiée et agiter pendant 45 min à 1 heure à l'aide d'un agitateur magnétique. Injecter.

### 2.6.2. Préparation des échantillons dégradés pour le test de stress

- ❖ Prises d'essai : Matière première : ~50.0 mg ; Essai : ~ 41 mg
- ❖ Conditions de dégradation : Voir tableau **VII**
- ❖ Préparation des échantillons dégradés avec l'acide fort : Peser exactement la prise d'essai dans une fiole jaugée de 50 mL. ajouter 1 mL d'acide chlorhydrique 0.5M, laisser la solution dans les conditions de dégradation. Neutraliser la solution avec 1 mL d'hydroxyde de sodium 0,5M. Compléter au trait de jauge avec l'eau purifiée.
- ❖ Préparation des échantillons dégradés avec une base forte : Peser exactement la prise d'essai de chaque échantillon dans une fiole jaugée de 50 mL. Ajouter 1 mL d'hydroxyde de sodium 0,1M, laisser la solution dans les conditions de dégradation. Neutraliser la solution avec 1 mL d'acide chlorhydrique 0,1M. Compléter au trait de jauge avec l'eau purifiée.
- ❖ Préparation des échantillons dégradés avec une l'oxydant : Peser exactement la prise d'essai de chaque échantillon dans une fiole jaugée de 50 mL. Ajouter 1 mL de la solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3%, laisser la solution dans les conditions de dégradation, neutraliser doucement la solution si nécessaire. Compléter au trait de jauge avec l'eau purifiée. Injecter
- ❖ Préparation des échantillons dégradés avec la chaleur : Peser exactement la prise d'essai de chaque échantillon dans une fiole jaugée de 50 mL. Placer au four la solution à 85°C pendant 3 heures. Injecter.

### 2.6.3. Préparation des échantillons pour le test de validation analytique

- ❖ Préparation de la solution Essai : Dans une fiole jaugée de 2000 mL, introduire une quantité équivalente de 1640 mg de la prise d'essai, ajouter 900ml d'eau purifiée, agiter pendant 45 min à 1 heure à l'aide d'un agitateur magnétique et compléter au volume avec le même solvant.
- ❖ Préparation de la solution du mélange de placebo : Dans une fiole jaugée de 2000 mL, introduire 466 mg du placebo, diluer au volume avec de l'eau R et agiter pendant 45 min à 1 heure à l'aide d'un agitateur magnétique.
- ❖ Préparation de la solution Essai dopé : Dans une fiole jaugée de 50 mL, introduire environ 41 mg de l'échantillon, et 5mL de chaque solution mère d'impureté, ajouter de l'eau purifiée, agiter pendant 45 min à 1 heure à l'aide d'un agitateur magnétique et compléter au volume avec le même solvant.

## 2.7. Paramètres de validation

Les paramètres vérifiés sont les suivants :

**Tableau VI** .Paramètres de validation vérifiés

Série N°	Paramètres de validation	Vérification
1	Spécificité- (Etude d'interférence)	✓
2	Linéarité	Linéarité du standard d'amoxicilline
		Linéarité des impuretés
3	Exactitude	✓
4	Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	✓
5	Limite de détection	✓
6	Limite de quantification	✓
7	Stabilité de la solution du standard d'amoxicilline	✓
8	Robustesse	✓

## 2.8. Formule de calcul

Le calcul de la quantité de chaque impureté, réalisé par rapport au témoin d'amoxicilline, est exprimé en « équivalent d'amoxicilline ».

$$\% \text{ de l'impureté} = \frac{A_e}{A_s} \times \frac{V_e}{V_s} \times \frac{P_s \times P}{P_e} \times Fu \times RRF \times 100$$

Où :

$A_e$  : Aire du pic d'impureté de l'échantillon

$V_e$  : Volume de dilution de la solution échantillon (mL).

$P_e$  : Prise d'essai de l'échantillon (g).

$Fu$  : Coefficient multiplicateur de l'échantillon =  $\frac{\text{Masse théorique du lot}(g)}{\text{Teneur théorique en amox de l'échantillon}(g)}$

RRF : Facteur de réponse relatif de l'impureté (RRF).

$A_s$  : surface du pic du standard.

$V_s$  : Volume de dilution du standard (mL).

$P_s$  : Prise d'essai du standard en g.

$P$  : titre du standard en %.

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### PARTIE 1. Test de stress

Le test de stress vise à générer 5 à 30% de dégradation sous n'importe quelles conditions de stress.

Du fait de la variabilité significative de la stabilité de la molécule d'amoxicilline, il est impossible de trouver des conditions de stress universelles entre matière première et produit fini. C'est pour cette raison qu'il a été nécessaire pour ce travail de réaliser une étude préliminaire afin de trouver les conditions optimales pour atteindre un taux de dégradation acceptable.

##### 3.1. Conditions de dégradation

Le tableau VII présente les conditions de stress retenu pour la réalisation du test de dégradation.

Tableau VII. Conditions de stress pour le test de stress de l'amoxicilline

Stress	Echantillon	Condition de stress	Temps d'exposition
Hydrolyse acide	Matière première	1 M de HCl	2 h
	Produit fini	1 M de HCl	1 h
Hydrolyse basique	Matière première	1 M de NaOH	2 min
	Produit fini	0.5M de NaOH	5 min
Oxydation	Matière première	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 3%	30 min
	Produit fini	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 3%	30 min
Chaleur	Matière première	85°C à L'étuve	3 h
	Produit fini	85°C à L'étuve	3 h

##### 3.2. Résultats du test de stress

Les conditions de stress et les données sur les % de dégradation sont présentées dans le tableau VIII.

Tableau VIII. Conditions d'étude de stress et les résultats obtenus sur les % de dégradation

Condition de dégradation	Température	Condition de stress	Echantillon	Pesée en mg	Aire du pic de l'amoxicilline	% de dégradation
Non stressée	Ambiante	T0	Amoxicilline ( MP)	59,6	10556267	0
			Produit fini	41,0	5645269	0
Stressé par un acide fort	Ambiante	1M de HCL pdt 2h	Amoxicilline ( MP)	59,6	9269338	12
		1M de HCL pdt 1h	Produit fini	41,0	5141695	9
Stressé par une base forte	Ambiante	1M de NaoH pdt 2min	Amoxicilline ( MP)	59,6	8468178	20
		0.5M de NaoH 5min	Produit fini	41,0	3938865	30
Stressé par un oxydant	Ambiante	T=30 minutes	Amoxicilline ( MP)	59,6	8319043	21
			Produit fini	41,0	4923831	13
Stressé par la chaleur	85°C	T=3 heures	Amoxicilline ( MP)	59,6	7404709	30
			Produit fini	41,0	4340394	23

Les résultats des aires de l'amoxicilline et des impuretés obtenus de chaque condition de stress sont présentés dans le tableau IX.

Tableau IX. Résultats des aires de l'amoxicilline et des impuretés obtenus de chaque condition de stress

Condition de dégradation	Echantillon	Aire du pic de l'amoxicilline	Aire du pic de impureté I	Aire du pic de impureté D( $\alpha$ )	Aire du pic de impureté J	Aire du pic de impureté D( $\beta$ )	Pureté du pic d'amoxicilline
Non stressée	Amoxicilline ( MP)	10556267	34065	23937	43119	0	oui
	Produit fini	5645269	17537	14569	23717	0	oui
Stressé par un acide fort	Amoxicilline ( MP)	9269338	35501	955802	29120	302574	oui
	Produit fini	5141695	17272	111647	19416	32271	oui
Stressé par une base forte	Amoxicilline ( MP)	8468178	37491	1481300	38836	225534	oui
	Produit fini	3938865	15864	956823	18964	33030	oui
Stressé par un oxydant	Amoxicilline ( MP)	8319043	0	1380658	28197	58837	oui
	Produit fini	4923831	0	447958	18908	7971	oui
Stressé par la chaleur	Amoxicilline ( MP)	7404709	56372	0	4757	0	oui
	Produit fini	4340394	0	102213	46063	0	oui

Les résultats des pourcentages de l'amoxicilline et des impuretés obtenus de chaque condition de stress sont présentés dans le tableau X.

Tableau X. Résultats des pourcentages de l'amoxicilline et des impuretés obtenus de chaque condition de stress

Condition de dégradation	Echantillon	% l'amoxicilline	% impureté I	% impureté D( $\alpha$ )	% impureté J	% impureté D( $\beta$ )	Pureté du pic d'amoxicilline
Non stressée	Amoxicilline ( MP)	99,05	0,32	0,22	0,40	0,00%	oui
	Produit fini	99,03	0,31	0,26	0,41	0,00%	oui
Stressé par un acide fort	Amoxicilline ( MP)	87,81%	0,34%	9,05%	0,28%	2,87%	oui
	Produit fini	91,08%	0,3%	2,0%	0,3%	0,6%	oui
Stressé par une base forte	Amoxicilline ( MP)	80,22%	0,36%	14,03%	0,37%	2,4%	oui
	Produit fini	69,77%	0,28%	16,95%	0,34%	0,59%	oui
Stressé par un oxydant	Amoxicilline ( MP)	78,81%	0,00%	13,08%	0,27%	0,56%	oui
	Produit fini	87,22%	0,00%	7,94%	0,33%	0,14%	oui
Stressé par la chaleur	Amoxicilline ( MP)	70,15%	0,53%	0,00%	0,05%	0,00%	oui
	Produit fini	76,89%	0,00%	1,81%	0,82%	0,00%	oui

Les autres impuretés engendrées à des concentrations très basses ne sont pas prises en considération, car certaines sont présentes également dans les échantillons non stressés et d'autres apparaissent à des taux très bas.

Les résultats du test de la pureté chromatographique notés dans les chromatogrammes et donnés par le détecteur UV-PDA confirment l'homogénéité et la pureté du pic d'amoxicilline dans tous les échantillons soumis aux différentes conditions de stress.

### 3.3. Discussion des résultats du test de stress

La dégradation par hydrolyse basique est très intéressante puisqu'elle engendre deux impuretés majeures D ( $\alpha$ ) et D ( $\beta$ ) avec des taux très élevés dans un temps d'exposition minimale à l'état de matière première et PF. Donc l'échantillon ainsi dégradé peut être considéré comme un système de conformité de l'amoxicilline, qui ne donne que les informations qualitatives sur les produits de dégradation de l'Amoxicilline. Afin de pallier à cette dégradation il est important d'éviter les excipients basiques lors de la formulation.

La dégradation par hydrolyse acide nécessite des conditions de stress plus sévères (forte concentration de l'acide et un temps d'exposition plus long) afin d'entraîner la dégradation du principe actif à un taux plus ou moins acceptable. On peut dire que l'amoxicilline présente une résistance vis-à-vis à l'hydrolyse acide en fonction du temps. Nous retrouvons dans le chromatogramme représentatif de cette dégradation, la génération de deux impuretés majeures à des taux très importants à l'état de matière première. Ce taux est par contre, réduit au passage au PF.

La dégradation oxydative, par le peroxyde d'hydrogène, montre que la molécule devient beaucoup plus sensible à l'effet de dégradation autant dans l'état de matière première que dans l'état du produit fini avec l'apparition des impuretés D ( $\alpha$ ) et D ( $\beta$ ) à des taux élevés. Nous remarquons que les impuretés formées sont celles trouvées dans les conditions basiques et acides.

La dégradation par la chaleur montre que l'amoxicilline est stable à l'état de matière première. Quand il est exposé à une haute température, nous remarquons une augmentation minimale et non-significative de l'impureté I. Contrairement aux résultats de l'analyse du PF dégradé à la chaleur sèche montre une dégradation considérable avec génération de l'impureté D ( $\alpha$ ) et J.

L'exposition de notre échantillon aux différentes conditions de stress pendant des durées de plus en plus grandes permet de constater l'accroissement du taux des impuretés préalablement générées (Impureté D ( $\alpha$ ), impureté J et impureté I) et/ou la formation de nouvelles impuretés (impureté D ( $\beta$ )). Dans d'autres cas, nous observons la diminution du taux de certaines d'entre elles et/ou la disparition d'autres impuretés. Cela peut être expliqué par la survenue de dégradation secondaire. Un couplage HPLC-PDA s'avère d'une utilité pour élucider cette perte.

Les résultats de l'étude de stress de la matière première et du produit finis montre que l'amoxicilline est très sensible à l'hydrolyse basique, à l'oxydation et à l'hydrolyse acide lors d'exposition à des conditions de stress plus longues. En effet, l'exposition à ces conditions de stress permet d'engendrer à peu près quatre impuretés, dont deux sont majeures à des proportions différentes. L'introduction d'antioxydant dans la formulation peut s'avérer être une bonne stratégie pour la stabilisation de la molécule.

Toutefois, la dégradation par la chaleur n'induit pas la formation des impuretés majeures obtenus avec les autres conditions de dégradation, mais génère deux autres impuretés à des taux variables. On peut donc postuler que les conditions de stockage du PF devraient prendre en considération ces données.

Nous concluons aussi que la matière première de l'amoxicilline est beaucoup plus sensible aux conditions de stress par rapport à formulation du PF. Ceci est dû à la présence des excipients dans la formulation du PF qui protège la molécule d'amoxicilline de la dégradation par haute température, par oxydation et par hydrolyse acide et basique.

## PARTIE 2. VALIDATION DE LA METHODE DU DOSAGE DES PRODUITS DE DEGRADATION DE L'AMOXICILLINE PAR HPLC

La validation de la méthode de dosage des impuretés d'amoxicilline sera limitée aux **produits de** dégradation (ICH Q6a). les impuretés concernés sont l'impureté C, D ( $\alpha$ ), D ( $\beta$ ), E (1), E (2) et F (limite de spécification  $\leq 1\%$ ).

### 1. Spécificité

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes.

#### 1.1. Spécificité- impuretés connues

Tableau XI. Temps de rétention des impuretés connues

Catégorie de l'impureté selon le DMF	Impureté	Temps de rétention (min)
Impureté de synthèse	Impureté A	1,130
Impureté de dégradation	Impureté C	8,937
Impureté de dégradation	Impureté D ( $\alpha$ )	2,541
Impureté de dégradation	Impureté D ( $\beta$ )	2,070
Impureté de dégradation	Impureté E (1)	6,688
Impureté de dégradation	Impureté E (2)	8,169
Impureté de dégradation	Impureté F	9,040
Impureté de synthèse	Impureté G	6,590
Impureté de synthèse	Impureté H	9,364
Impureté de synthèse	Impureté I	0,535
Impureté de dégradation	Impureté J	12,991

#### 1.2. Spécificité- excipients

- Mélange de placebo

Tableau XII. Temps de rétention des excipients

Excipients	Temps de rétention
Benzoate de sodium	9,853
Aspartam	11,532
Arôme pêche citron fraise	11,195

### 1.3. Spécificité- Essai dopé avec les impuretés de dégradations

- Essais dopés avec les impuretés de dégradations

Tableau XIII. Temps de rétention des impuretés dans l'essai dopé

Molécule	Temps de rétention (min)
Amoxicilline	2,907
Impureté C	8,941
Impureté D ( $\alpha$ )	2,5
Impureté D ( $\beta$ )	2,069
Impureté E (1)	6,776
Impureté E (2)	8,324
Impureté F	9,317
Impureté J	12,376
Excipients	
Benzoate de sodium	9,871
Aspartam	11,303
Arôme pêche citron fraise	11,043

### 1.4. Récapitulatif des résultats de spécificité et critères d'acceptation

Tableau XIV. Tableau récapitulatif des résultats de spécificité et critères d'acceptation

Composants	Temps de rétention du pic principal dans les solutions standards	Temps de rétention du pic principal dans l'essai dopé	Présence de pic ayant le même temps de rétention que le pic principal	
			Blanc	Placebo
Amoxicilline	2,9	2,9	Absence	Absence
Impureté A	1,130	ND	Absence	Absence
Impureté C	8,937	8,941	Absence	Absence
Impureté D ( $\alpha$ )	2,541	2,5	Absence	Absence
Impureté D ( $\beta$ )	2,070	2,069	Absence	Absence
Impureté E (1)	6,688	6,776	Absence	Absence
Impureté E (2)	8,169	8,324	Absence	Absence
Impureté F	9,040	9,317	Absence	Absence
Impureté G	6,590	6,469	Absence	Absence
Impureté I	0,535	0,535	Absence	Absence
Impureté J	12,991	12,376	Absence	Absence

#### Normes

Absence d'interférence entre les pics des chromatogrammes du blanc, des standards, des excipients, et d'autres impuretés ou d'autres produits de dégradation présentes dans la matrice

de l'échantillon. (Référence ICH Q2 (R1) ; 1.2). La résolution entre les différents pics doit être  $\geq 1,0$ .

### Conclusion

- Le chromatogramme de l'amoxicilline montre un pic intégré avec un temps de rétention de 2,907 min pour l'essai dopé.
- Le chromatogramme du blanc ne met en évidence aucun pic.
- Les chromatogrammes des impuretés connues montrent des pics séparés et intégrés.
- Le chromatogramme du mélange des impuretés connues montrent des pics séparés et intégrés.
- Le temps de rétention de chacune des impuretés n'interfère pas avec celui de l'amoxicilline.
- Le chromatogramme du placebo ne met en évidence aucun pic au temps de rétention de l'amoxicilline et des impuretés obtenu dans le chromatogramme du standard d'amoxicilline et du mélange des impuretés.

De ceci, On conclut donc que la méthode de la recherche des impuretés et produits de dégradation de l'amoxicilline dans la poudre pour suspension buvable est spécifique vis-a-vis de la recherche des impuretés connues.

### Détermination du Temps de Rétention Relatif (RRT) :

Pour les impuretés éluées avant l'amoxicilline, les RRT sont calculés par rapport à l'amoxicilline :

$$\text{RRT} = \text{TR de l'impureté (min)} / \text{TR de l'amoxicilline (min)}$$

Pour les impuretés éluées après l'amoxicilline, les RRT sont calculés par rapport au Penilloic-1 :

$$\text{RRT} = \text{TR de l'impureté (min)} / \text{TR de Penilloic (min)}$$

**Tableau XV.** Temps de Rétention Relatif de l'amoxicilline et les impuretés

Composés	RT	RRT
Amoxicilline	3,007	1,00
Imp C	8,535	1,36
Imp D : ( $\beta$ )	2,141	0,71
Imp D : ( $\alpha$ )	2,595	0,86
Imp E (1)	6,289	1,00
Imp E (2)	7,856	1,25
Imp F	8,943	1,42
Imp J	13,22	2,10

## 2. Linéarité

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon.

### 2.1 Linéarité du standard d'amoxicilline

L'étude de la linéarité du dosage du standard d'Amoxicilline est évaluée à 5 niveaux (0.5, 50, 100, 120 et 150) pour chacune des concentrations équivalentes à 0,05%, 5%, 10%, 12% et 15% de la concentration de l'amoxicilline dans le produit fini.

### 2.2. Linéarité des impuretés

L'étude de la linéarité du dosage des impuretés de dégradation est évaluée pour chacune des concentrations équivalentes à 0.05%, 0.5%, 1%, 1.2% et 1.5% de la concentration des impuretés à la limite de spécification

### 2.3. Résultats du test de linéarité du standard d'amoxicilline

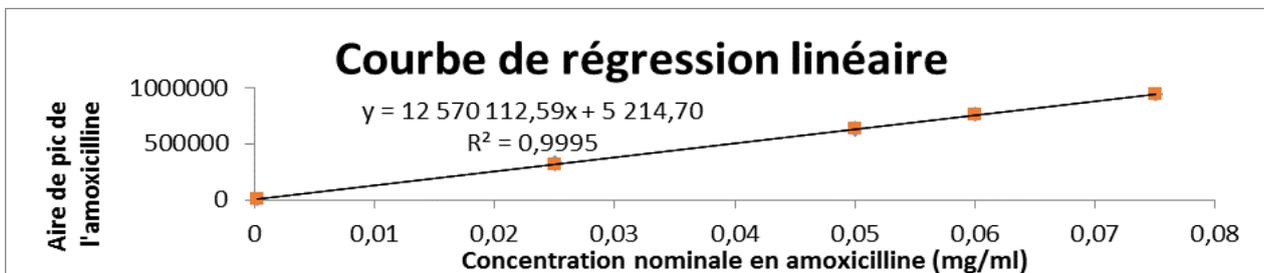
Les résultats sont reportés dans les tableaux ci-dessous.

**Tableau XVI.** Résultats des aires du standard d'amoxicilline

Niveau	% de la cible	Concentration (mg/mL)	Volume à prélever de la solution mère (mL)	Volume de dilution (mL)	Concentration de la solution mère (mg/mL)	Aire du pic Amoxicilline
0,5	0,05%	0,00025	0,5	200	0,1	2833
	0,05%	0,00025	0,5	200		2902
	0,05%	0,00025	0,5	200		2804
50	5%	0,025	5	20	0,1	313088
	5%	0,025	5	20		330272
	5%	0,025	5	20		334189
100	10%	0,05	10	20	0,1	638083
	10%	0,05	10	20		628438
	10%	0,05	10	20		641790
120	12%	0,06	15	25	0,1	768294
	12%	0,06	15	25		759374
	12%	0,06	15	25		757246
150	15%	0,075	15	20	0,1	942596
	15%	0,075	15	20		939892
	15%	0,075	15	20		945018

**Tableau XVII.** Statistiques de la régression linéaire du standard d'amoxicilline

Statistiques de la régression	
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	0,999541061
Erreur-type	7664,78475
Observations	15



**Figure 1.** Courbe de régression linéaire du standard d'amoxicilline

Les tableaux ci-dessous, présentent l'analyse de variance du test de linéarité :

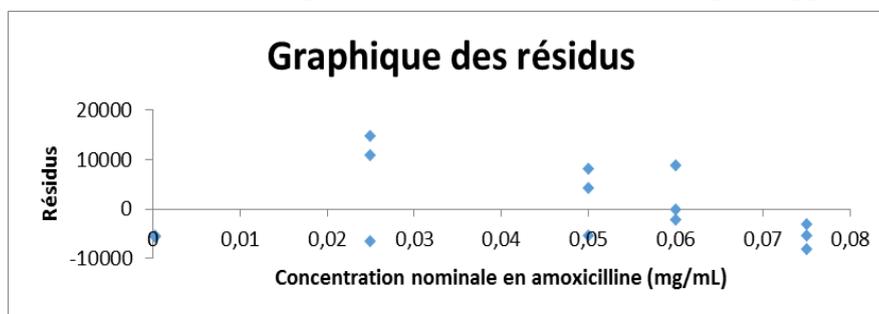
**Tableau XVIII.** Analyse de variance du test de linéarité du standard

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F	Signification de F < 0.05
Régression	1	1,66337E+12	1,66337E+12	28313,2172	4,34627E-23	conforme
Résidus	13	763736028,5	58748925,27			
Total	14	1,66413E+12				

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité	Limite inférieure pour seuil de confiance = 95%	Limite supérieure pour seuil de confiance = 95%
Ordonnée à l'origine (b)	5214,698731	3712,736546	1,404543163	0,18359744	-2806,180933	13235,5784
Pente (a)	12570112,59	74704,12057	168,2653179	4,3463E-23	12408724,15	12731501,04

#### Analyse des résidus

Le graphe ci-dessous, montre la répartition aléatoire des résidus par rapport aux quantités théoriques :



**Figure 2.** Graphe des résidus de la linéarité du standard d'amoxicilline

**Tableau XIX.** Résultats des aires des impuretés de dégradation

Concentration impureté (%)	Concentration impureté (MG/ML)	Aire Impureté C	Aire Impureté D ( $\alpha$ )	Aire Impureté D ( $\beta$ )	Aire Impureté E (isomère 1)	Aire Impureté E (isomère 2)	Aire Impureté F
0.05%	0,00025	2453	1822	1787	315	545	3237
	0,00025	3560	1817	1891	367	607	3095
	0,00025	3172	1730	1756	210	586	3222
0.5%	0,0025	23259	17966	19552	6117	6960	35346
	0,0025	22999	18030	19522	6153	6773	35229
	0,0025	32386	17926	19166	6560	7039	35026
1%	0,005	46136	35191	39031	12752	13803	70024
	0,005	46783	34952	39103	13054	13750	70307
	0,005	47110	35153	39665	12607	13775	69580
1.2%	0,006	56901	41380	47363	15166	16514	83621
	0,006	56739	41387	47561	15083	16417	83904
	0,006	55846	41537	48147	15331	16598	83319
1.5%	0,0075	69803	51557	60053	19431	20853	102873
	0,0075	72025	51439	60075	19445	20510	104000
	0,0075	70328	51007	59212	18978	20684	104881

**Tableau XX.** Statistiques de la régression linéaire des impuretés

Statistiques de la régression						
	Impureté C	Impureté D( $\alpha$ )	Impureté D( $\beta$ )	Impureté E (1)	Impureté E (2)	Impureté F
Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	0,9913	0,9995	0,9997	0,9992	0,9998	0,9998
Erreur-type	2391,683	420,292	377,547	198,656	103,945	579,547
Observations	15	15	15	15	15	15



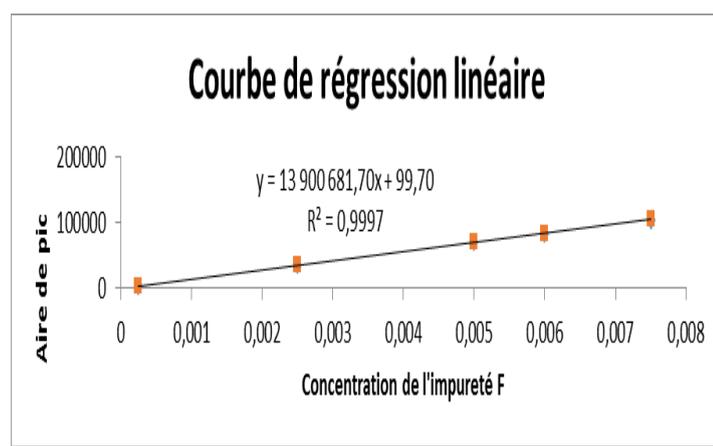
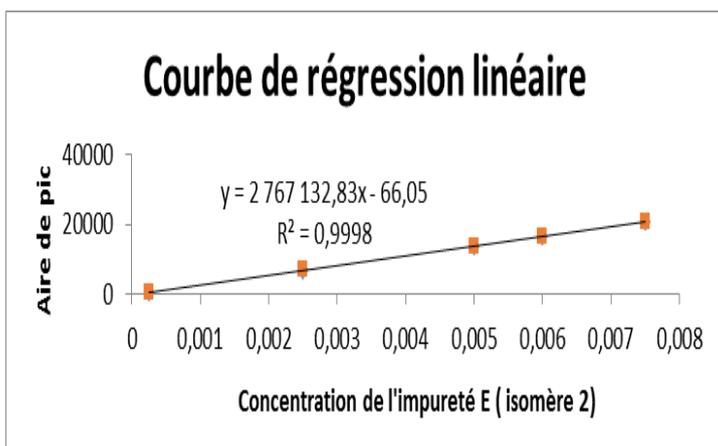
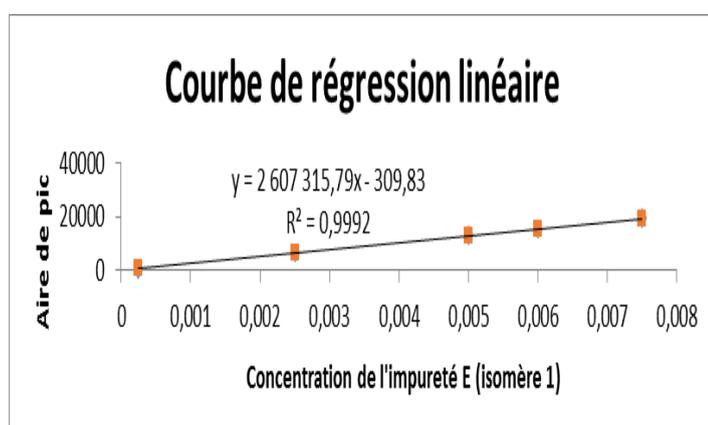
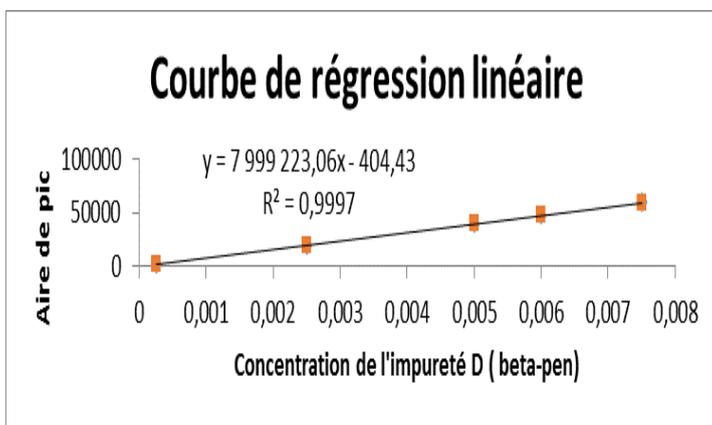


Figure 3. Courbe de régression linéaire des impuretés

Tableau XXI .Analyse de variance du test de linéarité des impuretés

		Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F	Signification de F < 0.05
Impureté C	Régression	1	8425594216	8425594216	1472,96776	9,14E-15	conforme
	Résidus	13	74361929,5	5720148,43			
	Total	14	8499956145				
Impureté D (α)	Régression	1	4651612620	4651612620	26333,0922	6,96E-23	conforme
	Résidus	13	2296386,75	176645,135			
	Total	14	4653909007				
Impureté D (β)	Régression	1	6382760060	6382760060	44778,1318	2,21E-24	conforme
	Résidus	13	1853044,72	142541,902			
	Total	14	6384613105				
Impureté E (isomère 1)	Régression	1	678110039	678110039	17182,9283	1,11E-21	conforme
	Résidus	13	513034,236	39464,172			
	Total	14	678623073				
Impureté E (isomère 2)	Régression	1	763788155	763788155	70690,9543	1,14E-25	conforme
	Résidus	13	140459,923	10804,6095			
	Total	14	763928615				
Impureté F	Régression	1	1,9275E+10	1,9275E+10	57386,2435	4,41E-25	conforme
	Résidus	13	4366371,24	335874,711			
	Total	14	1,9279E+10				

		Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité	Limite inférieure pour seuil de confiance = 95%	Limite supérieure pour seuil de confiance = 95%
Impureté C	Ordonée à l'origine	1573,28759	1190,43459	1,32160776	0,20908568	-998,4899	4145,065
	Pente (a)	9190599	239467,84	38,3792621	9,14E-15	8673260,18	9707937,81
Impureté D (α)	Ordonée à l'origine	503,804887	209,195688	2,40829479	0,03159053	51,865079	955,74
	Pente (a)	6828814,54	42081,8078	162,274743	6,96E-23	6737902,32	6919726,76
Impureté D (β)	Ordonée à l'origine	-404,4313	187,920069	-2,152145	0,05075705	-810,40795	1,545
	Pente (a)	7999223,06	37802,0038	211,60844	2,21E-24	7917556,79	8080889,32
Impureté E (isomère 1)	Ordonée à l'origine	-309,8254	98,8788454	-3,133384	0,007921	-523,44019	-96,210
	Pente (a)	2607315,79	19890,47	131,083669	1,11E-21	2564345,04	2650286,54
Impureté E (isomère 2)	Ordonée à l'origine	-66,04787	51,7376176	-1,2765928	0,22407968	-177,8202	45,7244577
	Pente (a)	2767132,83	10407,5399	265,877706	1,14E-25	2744648,71	2789616,96
Impureté F	Ordonée à l'origine	99,7027569	288,463283	0,34563413	0,73514672	-523,48428	722,89
	Pente (a)	13900681,7	58027,2783	239,55426	4,41E-25	13775321,4	14026042



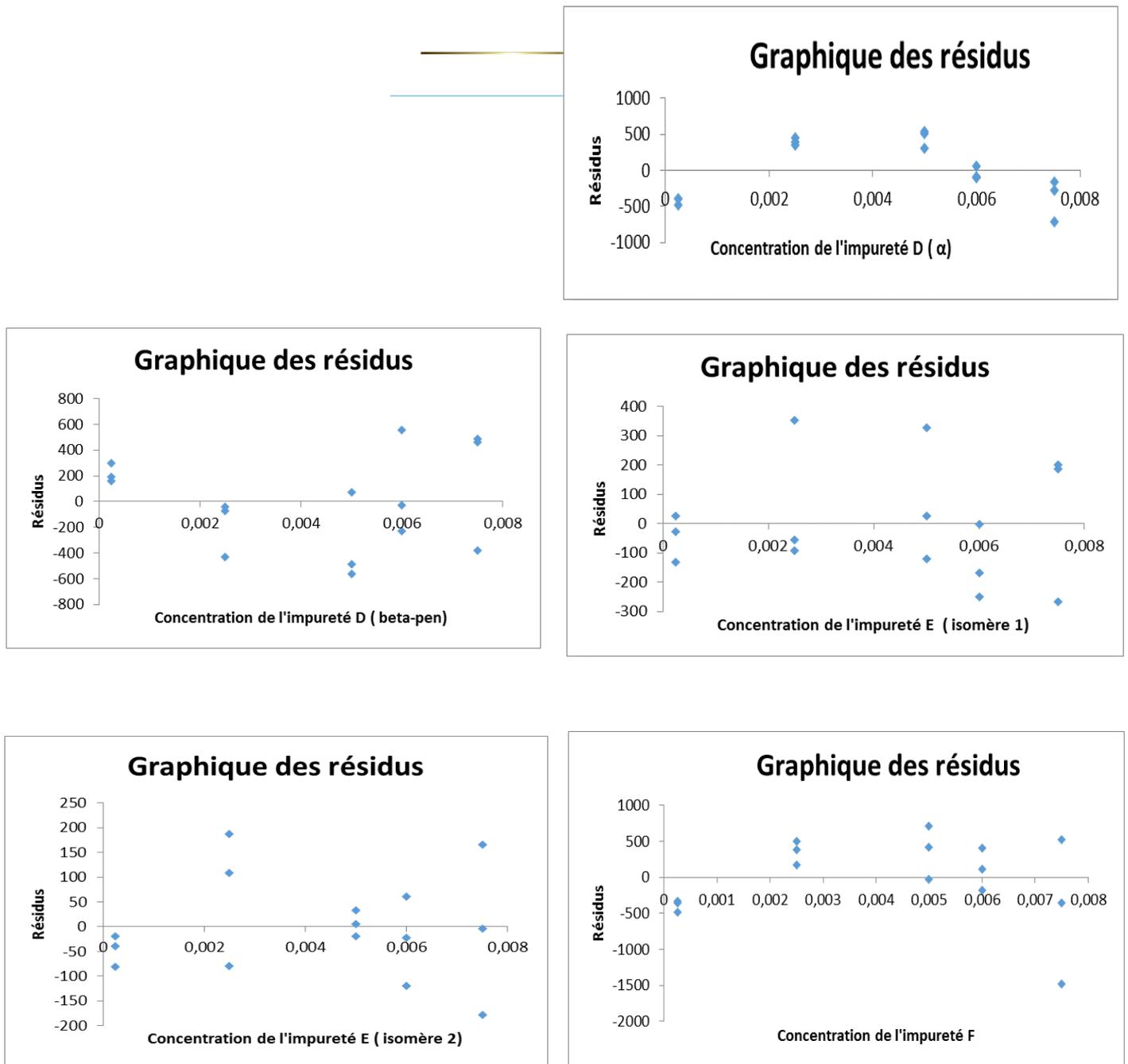


Figure 4. Graphe des résidus de la linéarité des impuretés

Récapitulatif des résultats de linéarité :

**Tableau XXII. Récapitulatif des résultats de linéarité**

Critère	Standard d'amoxicilline	Impureté C	Impureté D (α)	Impureté D (β)	Impureté E (isomère 1)	Impureté E (isomère 2)	Impureté F
Pente	12570112,59	9190598,997	6828814,53	7999223,058	2607315,789	2767132,832	13900681,7
Ordonnée à l'origine	5214,698	1573,287594	503,804887	-404,43132	-309,8254	-66,0478697	99,702756
Sommes des carrés des résidus	763371685,9	74361929,54	2296386,752	1853044,72	513034,236	140459,9233	4366371,2
Signification pratique de l'ordonnée à l'origine (%)	0,82%	3,31%	1,45%	1,02%	2,43%	0,48%	0,14%
Coefficient de corrélation	0,9995	0,9910	0,9995	0,9997	0,9992	0,9998	0,9997
Analyse des résidus	Pas de tendance systématique						

Norme

- Coefficient de corrélation  $\geq 0,990$
- Signification pratique de l'ordonnée à l'origine  $\leq 20 \%$ .
- Analyse des résidus aléatoire, pas de tendances systématiques.

Conclusion

Au vu des paramètres cités précédemment, on conclut que l'étude de linéarité du standard d'amoxicilline et des impuretés sont linéaires elles :

- mettent en évidence une analyse de résidus conforme avec des résidus petits et aléatoires.
- montrent des régressions linéaires conformes avec des coefficients de corrélation  $\leq 0,990$
- montrent des significations pratiques de l'ordonnée à l'origine conformes à la norme

**3. Exactitude**

L'exactitude est la mesure de l'étroite concordance entre la valeur trouvée dans un échantillon par la méthode et la valeur qui est adoptée soit comme une valeur de référence, soit comme une valeur conventionnellement vraie.

L'étude de l'exactitude s'effectue à 3 niveaux (5, 100 et 150) des concentrations équivalentes à 0,05%, 1 % et 1,5% du domaine d'utilisation de la méthode (Référence ICH Q2 (R1), 4.3).

Le jugement de conformité de l'exactitude de la méthode analytique en question est porté sur la base des critères suivants :

Critères d'acceptation

- Le pourcentage de recouvrement pour tous les échantillons doit être compris entre 80 et 120%.
- Le CV% des pourcentages de recouvrement doit être  $\leq 20$  %.

Résultats de l'exactitude des impuretés

**Tableau XXIII.** Résultats d'exactitude du dosage des impuretés

Niveau	Impuretés C	Impureté D ( $\alpha$ )	Impureté D ( $\beta$ )	Impureté E (isomère 1)	Impureté E (isomère 2)	Impureté F
	% Recouvrement	% Recouvrement	% Recouvrement	% Recouvrement	% Recouvrement	% Recouvrement
<b>0,05%</b>	98,2	102,9	99,18	97,917	101,0	97,0
<b>0,05%</b>	90,5	102,0	96,29	95,573	110,2	93,9
<b>0,05%</b>	95,0	102,7	92,94	97,375	107,2	99,7
<b>1%</b>	99,0	98,7	99,55	112,794	93,4	111,2
<b>1%</b>	99,7	99,2	99,19	110,642	96,4	111,7
<b>1%</b>	98,6	88,2	99,54	105,958	101,0	116,1
<b>1,50%</b>	100,0	102,0	92,66	107,074	97,4	112,1
<b>1,50%</b>	100,5	101,8	100,55	114,542	97,4	115,3
<b>1,50%</b>	100,4	103,4	95,32	113,035	98,2	119,8
Moyenne	98,0	100,1	97,25	106,1	100,3	108,5
Ecart type	3,3	4,8	3,03	7,4	5,4	9,3
% RSD	3,3	4,7	3,11	7,0	5,4	8,5
Intervalle de confiance à 95 % ( $\pm$ )	2,1	3,1	1,98	4,8	3,5	6,0

Tous les recouvrements individuels se situent dans les critères d'acceptation de 80,0 % à 120,0%.

La moyenne globale des recouvrements se situe dans une fourchette de 80,0 % à 120,0%.

La moyenne globale des recouvrements appartient à l'intervalle de confiance à 95.

Le CV% des pourcentages de recouvrement est de 0,7% qui sont inférieurs à la norme fixée  $\leq 20.0\%$ .

Sur la base des résultats de recouvrement obtenus ci-dessus, il est conclu que la méthode est exacte vis-à-vis au dosage des impuretés et produits de dégradation.

#### 4. Fidélité

La fidélité ou la précision d'une méthode analytique est définie comme le degré de dispersion entre des séries de mesures par des prises à partir d'un échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité donne une explication sur les erreurs aléatoires.

Elle peut être exécutée à trois niveaux, à savoir la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité.

##### 4.1 Répétabilité

La répétabilité ou précision intra-analyse se rapporte à des essais dans les mêmes conditions de réalisation, dans de courts intervalles de temps, par le même opérateur utilisant le même équipement, dans un même laboratoire.

Le test de répétabilité est démontré par injection de 6 prises d'essai indépendantes d'un essai reconstitué d'impuretés à 100% auquel est ajoutée une quantité constante de la forme reconstituée à 100%

Le CV des six prises d'échantillons préparés indépendamment doit être  $\leq 20\%$ .

#### Résultats de répétabilité

**Tableau XXIV.** Résultats du test de répétabilité des impuretés

Niveau	% impureté C	% impureté D( $\beta$ )	% impureté D( $\alpha$ )	% impureté E (1)	% impureté E (2)	% impureté F
0%	0,031	0,023	0,175	0,031	0,119	0,00
0%	0,032	0,021	0,177	0,031	0,110	0,00
0%	0,034	0,024	0,179	0,033	0,083	0,00
1%	0,779	0,691	0,468	0,169	0,211	1,11
1%	0,784	0,688	0,471	0,180	0,224	1,12
1%	0,776	0,691	0,418	0,189	0,204	1,16
1%	0,784	0,703	0,488	0,174	0,209	1,17
1%	0,792	0,699	0,501	0,173	0,184	1,19
1%	0,804	0,693	0,500	0,185	0,199	1,18
<b>Moyenne</b>	0,787	0,694	0,474	0,178	0,205	1,15
<b>Ecart type</b>	0,010	0,005	0,031	0,007	0,014	0,03
<b>% RSD</b>	1,3	0,8	6,3	4,2	6,7	2,8
<b>Intervalle de confiance à 95% (<math>\pm</math>)</b>	0,008	0,004	0,024	0,006	0,011	0,025

Le CV des résultats de répétabilité pour six préparations d'échantillons individuels de chaque impureté est conforme au critère d'acceptation de  $\leq 20,0$  %. Donc la méthode de dosage des impuretés de dégradation est répétable.

#### 4.2 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire exprime la variabilité intra-laboratoire où les différents résultats obtenus par la même méthode en travaillant dans le même laboratoire, mais à des jours différents, en utilisant des appareils différents, avec différents opérateurs.

2 séries supplémentaires d'analyse sont réalisées sur 6 prises d'essai indépendantes pour la fidélité intermédiaire (Référence ICH Q2(R1) ; 5.1 et 5.2)

La première série supplémentaire est réalisée dans le même jour (jour 1) par un deuxième analyste (analyste 2) sur des équipements différents en utilisant des phases mobiles et/ou colonnes différentes.

La deuxième série supplémentaire est réalisée dans un jour différent (jour 2) par le même analyste (analyste 1).

#### Résultats de la fidélité intermédiaire des impuretés

- Impureté C

**Tableau XXV.** Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté C

	Technicien 1 jour 1	Technicien 1 jour 2	Technicien 2 Jour 2		
Essai 1	0,779	0,854	0,784		
Essai 2	0,784	0,849	0,795		
Essai 3	0,776	0,872	0,766		
Essai 4	0,784	0,844	0,800		
Essai 5	0,792	0,889	0,796		
Essai 6	0,804	0,862	0,770		
Moyenne	<b>0,787</b>	<b>0,862</b>	<b>0,785</b>	<b>0,81109</b>	Moyenne générale
Variance	0,0001	0,0003	0,0002	0,0002	Moyenne des variances
Ecartype	0,01	0,02	0,01	0,0019	Variance des moyennes
CV%	1,3	1,9	1,8	0,0003	Moyenne des carrés (ANOVA)
IC 95 (±)	0,008	0,013	0,012	0,02	IC 95 (±)

Paramètres de fidélité	Variance ( $\sigma^2$ )	Ecartype ( $\sigma$ )	CV%
------------------------	-------------------------	-----------------------	-----

Répétabilité	0,0001	0,010	1,3
Répétabilité moyenne	0,0002	0,014	1,7
Intergroupe	0,002	NA	NA
Précision intermédiaire	0,002	0,05	5,6

- Impureté D (  $\alpha$  )

**Tableau XXVI.** Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté D (  $\alpha$  )

	Technicien 1 jour 1	Technicien 1 jour 2	Technicien 2 Jour 2		
Essai 1	0,468	0,504	0,485		
Essai 2	0,471	0,511	0,473		
Essai 3	0,418	0,498	0,495		
Essai 4	0,488	0,511	0,506		
Essai 5	0,501	0,489	0,455		
Essai 6	0,5	0,476	0,499		
Moyenne	<b>0,474</b>	<b>0,498</b>	<b>0,486</b>	<b>0,48600</b>	Moyenne générale
Variance	0,0010	0,0002	0,0004	0,0005	Moyenne des variances
Ecartype	0,03	0,01	0,02	0,0001	Variance des moyennes
CV%	6,5	2,8	3,9	0,00002	Moyenne des carrés (ANOVA)
IC 95 (±)	0,025	0,011	0,015	0,0055	IC 95 (±)

Paramètres de fidélité	Variance ( $\sigma^2$ )	Ecartype ( $\sigma$ )	CV%
Répétabilité	0,0010	0,03	6,5
Répétabilité moyenne	0,0005	0,022	4,6
Intergroupe	0,0001	NA	NA
Précision intermédiaire	0,0006	0,024	<b>4,9</b>

- Impureté D (  $\beta$  )

**Tableau XXVII.** Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté D (  $\beta$  )

	Technicien 1 jour 1	Technicien 1 jour 2	Technicien 2 Jour 2		
Essai 1	0,691	0,685	0,670		
Essai 2	0,688	0,705	0,635		
Essai 3	0,691	0,694	0,656		
Essai 4	0,703	0,674	0,704		
Essai 5	0,699	0,681	0,696		
Essai 6	0,693	0,705	0,700		
Moyenne	<b>0,694</b>	<b>0,691</b>	<b>0,677</b>	<b>0,68721</b>	Moyenne générale
Variance	0,00003	0,0002	0,0008	0,0003	Moyenne des variances
Ecartype	0,01	0,01	0,03	0,0001	Variance des moyennes
CV%	0,8	1,9	4,1	0,00001	Moyenne des carrés (ANOVA)
IC 95 (±)	0,69	0,68	0,65	0,0042	IC 95 (±)

Paramètres de fidélité	Variance ( $\sigma^2$ )	Ecartype ( $\sigma$ )	CV%

Répétabilité	0,00003	0,006	0,8
Répétabilité moyenne	<del>0,0003</del>	<del>0,018</del>	2,6
Intergroupe	0,00002	NA	NA
Précision intermédiaire	0,0004	0,019	<b>2,7</b>

- Impureté E ( isomère 1)

**Tableau XXVIII.** Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté E (isomère 1)

	Technicien 1 jour 1	Technicien 1 jour 2	Technicien 2 Jour 2		
Essai 1	0,169	0,185	0,170		
Essai 2	0,18	0,205	0,183		
Essai 3	0,189	0,194	0,196		
Essai 4	0,174	0,174	0,204		
Essai 5	0,173	0,181	0,196		
Essai 6	0,185	0,205	0,210		
Moyenne	<b>0,178</b>	<b>0,191</b>	<b>0,193</b>	<b>0,187</b>	Moyenne générale
Variance	0,0001	0,0002	0,0002	0,0001	Moyenne des variances
Ecartype	0,01	0,01	0,01	0,0001	Variance des moyennes
CV%	4,3	6,7	7,5	0,00001	Moyenne des carrés (ANOVA)
IC 95 (±)	0,006	0,010	0,012	0,0037	IC 95 (±)
Paramètres de fidélité		Variance ( $\sigma^2$ )	Ecartype ( $\sigma$ )	CV%	
Répétabilité		0,0001	0,008	4,3	
Répétabilité moyenne		0,0001	0,012	6,4	
Intergroupe		0,00004	NA	NA	
Fidélité intermédiaire		0,0002	0,014	<b>7,2</b>	

- Impureté E ( isomère 2)

**Tableau XXIX.** Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté E (isomère 2)

	Technicien 1 jour 1	Technicien 1 jour 2	Technicien 2 Jour 2		
Essai 1	0,211	0,232	0,200		
Essai 2	0,224	0,249	0,215		
Essai 3	0,204	0,251	0,206		
Essai 4	0,209	0,232	0,204		
Essai 5	0,184	0,215	0,210		
Essai 6	0,199	0,227	0,216		
Moyenne	<b>0,205</b>	<b>0,234</b>	<b>0,208</b>	0,216	Moyenne générale
Variance	0,00018	0,0002	0,0000	0,0001	Moyenne des variances
Ecartype	0,01	0,01	0,01	0,0003	Variance des moyennes
CV%	6,5	5,8	3,1	0,00004	Moyenne des carrés (ANOVA)
IC 95 (±)	0,011	0,011	0,005	0,0080	IC 95 (±)
Paramètres de fidélité		Variance ( $\sigma^2$ )	Ecartype ( $\sigma$ )	CV%	

Répétabilité	0,0002	0,013	6,5
Répétabilité moyenne	<del>0,0001</del>	<del>0,012</del>	5,4
Intergroupe	0,0002	NA	NA
Fidélité intermédiaire	0,0004	0,019	<b>8,9</b>

- Impureté F

**Tableau XXX.** Résultats de la fidélité intermédiaire du dosage de l'impureté F

	Technicien 1 jour 1	Technicien 1 jour 2	Technicien 2 Jour 2		
Essai 1	1,11	1,14	1,15		
Essai 2	1,12	1,1	1,13		
Essai 3	1,16	1,19	1,14		
Essai 4	1,17	1,13	1,12		
Essai 5	1,19	1,19	1,18		
Essai 6	1,18	1,13	1,13		
Moyenne	<b>1,155</b>	<b>1,147</b>	<b>1,142</b>	<b>1,148</b>	Moyenne générale
Variance	0,00107	0,0013	0,00046	0,0009	Moyenne des variances
Ecartype	0,03	0,04	0,02	0,00005	Variance des moyennes
CV%	2,8	3,2	1,9	0,00001	Moyenne des carrés (ANOVA)
IC 95 (±)	0,026	0,029	0,017	0,0031	IC 95 (±)

Paramètres de fidélité	Variance ( $\sigma^2$ )	Ecartype ( $\sigma$ )	CV%
Répétabilité	0,0011	0,033	2,8
Répétabilité moyenne	0,0009	0,031	2,7
Intergroupe	0,0000	NA	NA
Fidélité intermédiaire	0,0009	0,031	<b>2,7</b>

Récapitulatif des résultats de fidélité intermédiaire :

**Tableau XXXI.** Récapitulatif des CV des impuretés

Paramètres de fidélité	Impureté C	Impureté D ( $\alpha$ )	Impureté D ( $\beta$ )	Impureté E (1)	Impureté E (2)	Impureté F
CV Répétabilité %	1,3	6,5	0,8	4,3	6,5	2,8
CV Répétabilité moyenne %	1,7	4,6	2,6	6,4	5,4	2,7
CV Fidélité intermédiaire %	5,6	4,9	2,7	7,2	8,9	2,7

Le jugement de conformité de la fidélité de la méthode analytique en question est porté sur la base des critères suivants :

Critères d'acceptation

- Le CV de chacune des séries prises indépendamment doit être  $\leq 20,0\%$ .
- Le CV de répétabilité moyenne et celui de la précision intermédiaire doivent être  $\leq 20,0\%$ .

## Conclusion

La méthode du dosage des impuretés est fidèle, avec un CV% de répétabilité moyenne de précision intermédiaire  $\leq 20,0\%$  pour toutes les impuretés de dégradation

### **5. Limite de détection et limite de quantification**

La limite de détection d'une procédure d'analyse correspond à la plus petite quantité à examiner détectée dans un échantillon de la substance analysée, sans obligatoirement donner la valeur exacte

La limite de quantification d'une méthode d'analyse représente un paramètre intervenant dans les analyses quantitatives où elle exprime la plus petite concentration d'un analyte dans un échantillon pouvant être évaluée avec un degré de précision et une exactitude admissible dans les conditions de fonctionnement indiquées de la méthode.

La limite de détection est déterminée en considérant la concentration de la solution témoin des impuretés pour laquelle le rapport signal / bruit  $\geq 3$

La limite de quantification est déterminée en considérant la concentration de la solution témoin des impuretés pour laquelle le rapport signal / bruit  $\geq 10$

## Résultats

**Tableau XXXII.** Limite de détection et limite de quantification de l'amoxicilline et ses impuretés

Solution	Solution	Concentration (%)	Concentration (mg/mL)	Concentration (ng/mL)	Rapport Singal/bruit
Amoxicilline	LQ	0,006	0,00003	30	2,9
	LD	0,017	0,00009	90	10,3
Impureté C	LQ	0,02	0,0001	100	3,3
	LD	0,05	0,00025	250	11,5
Impureté D ( $\alpha$ )	LQ	0,03	0,00015	150	2,7
	LD	0,05	0,00025	250	9,3
Impureté D ( $\beta$ )	LQ	0,03	0,00015	150	2,7
	LD	0,05	0,00025	250	9,8
Impureté E (1)	LQ	0,03	0,0001	100	3,6
	LD	0,05	0,00025	250	10,5

Impureté E (2)	LQ	0,03	0,0001	100	2,6
	LD	0,05	0,00025	250	9,5
Impureté F	LQ	0,03	0,00015	150	3,6
	LD	0,05	0,00025	250	12,3

## 6. Stabilité de la solution standard

La solution standard d'amoxicilline a été préparée selon la méthodologie décrite et stockés à température ambiante contrôlée. Les absorbances de la solution stockée ont été enregistrées comme indiqué dans le tableau suivant.

La différence absolue de dosage à chaque intervalle de temps, par rapport au dosage initial, a été calculée pour la solution étalon. Les résultats obtenus pour la solution standard sont présentés dans le tableau.

### Critères d'acceptation

La valeur absolue du % de différence doit être  $\leq 2\%$

### Résultats

**Tableau XXXIII.** Résultat de la stabilité du standard d'amoxicilline

Solution standard d'Amoxicilline	Aire à T0	Aire à T 12 heures	Aire à T18 heures	Aires à T 24 heures
Standard 1 d'amoxicilline	638685	640315	638551	640245
Standard 2 d'amoxicilline	640373	641735	641259	640758
<b>MOYENNE</b>	639529	641025	639905	640502
<b>Résultat</b>	<b>% valeur initiale</b>	<b>% valeur initiale</b>	<b>% valeur initiale</b>	<b>% valeur initiale</b>
	100,0%	100,2%	100,1%	100,2%
<b>Critères d'acceptation</b>	<b>98% ≤ % initiale ≤ 102,0%</b>			

La différence absolue de dosage pour la solution étalon stockée pendant 24 heures à température ambiante contrôlée est bien en dessous du critère d'acceptation de 2,0 au maximum.

Sur la base des données ci-dessus, il est conclu que la solution standard d'amoxicilline peut être utilisée jusqu'à 24 heures après sa préparation lorsqu'elle est conservé à température ambiante contrôlée.

## 7. Robustesse

La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par une légère modification des conditions expérimentales (un ou plusieurs paramètres). Elle donne une idée de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'utilisation.

La robustesse est réalisée en apportant les changements sur les conditions chromatographiques de la méthode afin d'évaluer l'impact sur l'analyse qualitativement et quantitativement. Les changements concernent les variations suivantes :

- Variation du débit de la pompe ( $\pm 10\%$  du débit déterminé) : évaluation à 1,3 mL/min et 1,5 mL/min.
- Variation de la température colonne ( $\pm 10\%$  de la température déterminée) : évaluation 19°C à 23°C.

### 7.1. Variation du débit de la pompe

- ✓ Evaluation de l'impact qualitatif du changement sur l'analyse à un débit  $\pm 10\%$

**Tableau XXXIV.** Vérification des paramètres du système de suitabilité après changement de débit

Paramètre	Normes	Débit (1,4 mL/min)	Débit -10% (1,3 mL/min)	Débit +10% (1,5 mL/min)
		Résultats		
Système de suitabilité				
Facteur de symétrie (pic d'amoxicilline)	$0,8 \leq t \leq 1,5$	1,2	1,2	1,1
Efficacité / nombre de plateaux théorique (pic d'amoxicilline)	$N \geq 4000$	7870	7760	7472
Temps de rétention d'Amoxicilline (min)	2,6 à 3,2 min	2,8	3,0	2,7
La résolution entre PA et l'impureté la plus proche	$R_s \geq 1,2$	1,8	1,9	1,8

- ✓ Evaluation de l'impact qualitatif et quantitatif du changement sur l'analyse à un débit  $\pm 10\%$

Détermination des aires de pics et pourcentages de chaque impureté dans les solutions dopées dans les conditions indiquées de la méthode ainsi que dans les conditions modifiées.

**Tableau XXXV.** Evaluation de l'impact du changement sur l'analyse à un débit  $\pm 10\%$ 

Composant	Solution essai dopé des impuretés								
	Débit indiqué de la méthode 1,4mL/min			Débit indiqué -10% 1,3mL/min			Débit indiqué +10% 1,5mL/min		
	Tr	Aire	% Impureté	Tr	Aire	% Impureté	Tr	Aire	% Impureté
Impureté ( $\beta$ )	1,98	52480	0,94	2,12	57299	0,95	1,85	49474	0,95
Impureté ( $\alpha$ )	2,4	43503	0,78	2,56	51594	0,86	2,26	48047	0,92
Impureté (1)	6,03	14241	0,25	6,28	14801	0,25	5,81	13057	0,25
Impureté (2)	7,6	18069	0,32	7,87	19014	0,32	7,36	16108	0,31
Impureté C	8,29	38588	0,69	8,55	41447	0,69	8,06	35775	0,69
Impureté F	8,9	21355	0,38	9,22	56928	0,95	ND	0	0,00

## 7.2. Variation de la température de la colonne

✓ Evaluation de l'impact qualitatif du changement sur l'analyse à température  $\pm 10\%$

**Tableau XXXVI.** Vérification des paramètres du système de suitabilité après changement de température

Paramètre	Normes	Température (1,4 mL/min)	Débit -10% (19°C)	Débit +10% (23°C)
		Résultats		
Système de suitabilité				
Facteur de symétrie (pic d'amoxicilline)	$0,8 \leq t \leq 1,5$	1,3	1,2	1,1
Efficacité / nombre de plateaux théorique (pic d'amoxicilline)	$N \geq 4000$	7098	7056	6970
Temps de rétention d'Amoxicilline (min)	2,6 à 3,2 min	2,8	2,9	2,8
La résolution entre PA et l'impureté la plus proche	$R_s \geq 1,2$	1,8	1,9	1,8

✓ Evaluation de l'impact qualitatif et quantitatif du changement sur l'analyse à un débit  $\pm 10\%$

Détermination des aires de pics et pourcentages de chaque impureté dans les solutions dopées dans les conditions indiquées de la méthode ainsi que dans les conditions modifiées.

**Tableau XXXVI.** Evaluation de l'impact du changement sur l'analyse à une température  $\pm$  10%

Composant	Solution essai dopé des impuretés								
	température indiquée 21°C			Température indiquée -10% 19°C			Température indiquée +10% 23°C		
	Tr	Aire	% Impureté	Tr	Aire	% Impureté	Tr	Aire	% Impureté
Impureté (β)	1,98	53643	1,10	2,12	58793	1,13	1,85	51526	1,14
Impureté (α)	2,40	44775	0,92	2,57	52729	1,01	2,26	48172	1,07
Impureté (1)	6,03	15110	0,31	6,29	15477	0,30	5,81	13550	0,30
Impureté (2)	7,60	18081	0,37	7,88	19826	0,38	7,36	17526	0,39
Impureté C	8,29	39231	0,81	8,56	42658	0,82	8,06	36747	0,82
Impureté F	8,90	55880	1,15	9,23	68285	1,31	8,60	10779	0,24

Norme :

Critère d'acceptation	
Résultats (% w/w)	Critères d'acceptation
< 0,25%	$\pm$ 0,05% Absolue
0,25% - 0,50%	$\pm$ 20% Relative
> 0,50% - 1,0%	$\pm$ 0,10% Absolue
> 1,0%	$\pm$ 10% Relative

Conclusion :

Le facteur de symétrie, le nombre de plateaux théoriques et la résolution entre l'amoxicilline et l'impureté la plus proche dans la solution du système de suitability ne sont pas modifiées de manière significative par la modification des conditions de débit, température et de pH.

La différence absolue et relative entre les résultats obtenus dans des conditions normales et l'étude de robustesse est dans les critères d'acceptation.

Sur la base des résultats ci-dessus, il est conclu que la méthode de détermination du dosage des impuretés est robuste vis-à-vis aux variations de débit et de température.

## 4. CONCLUSION GENERALE

---

La présence des impuretés à un taux élevé peut affecter à la fois la stabilité, l'efficacité et l'innocuité du médicament. Le test de stress joue un rôle très important dans l'évaluation de la stabilité de l'amoxicilline, en passant par le développement d'une méthode analytique appropriée permettant de détecter les produits de dégradation générés par le processus préalablement cité.

L'étude de la dégradation forcée dans de différentes conditions de stress, nous a permis de déterminer la sensibilité de l'amoxicilline à la dégradation en milieu basique et acide, par conséquent, il est impératif d'éviter les excipients basiques et acides lors de la formulation. Sa sensibilité à l'oxydation, l'introduction d'antioxydant dans la formulation peut s'avérer être une bonne stratégie pour la stabilisation de la molécule. L'amoxicilline est également sensible à la chaleur avec le temps. On peut donc postuler que les conditions de stockage du PF devraient éviter son exposition à une température élevée.

Le test de stress de l'amoxicilline a engendré quatre impuretés dont deux sont majeures à des taux importants. Ce qui confirme que le test de stress génère des produits de dégradation potentiel. De ce fait vient l'intérêt du développement d'une méthode analytique permettant de détecter un large éventail de ces impuretés et appropriée à une substance donnée.

La méthode du dosage et de la recherche des impuretés et produits de dégradation de l'amoxicilline choisie a été validée conformément à l'approche de l'ICH Q2 au vu des points suivants :

La méthode analytique du dosage des impuretés et produits de dégradation est :

- Spécifique.
- Linéaire, exacte et fidèle dans un intervalle de 80% à 120% de la concentration analysée.
- Robuste vis-à-vis aux variations des conditions chromatographiques de débit et température.
- Présente une limite de détection de 30 ng/ml et une limite de quantification de 90 ng/ml pour l'amoxicilline.
- Présente une limite de quantification de 250 ng/ml pour les impuretés.
- Présente une limite de détection de 100 ng/ml pour les impuretés C et E, et une limite de détection de 150 ng/ml pour les impuretés D et F.
- La solution du standard d'amoxicilline est stable pendant 24 à température ambiante contrôlée.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [1] Lignes directrices concernant le contrôle de la température des médicaments pendant l'entreposage et le transport (GUI-0069)
- [2]. Brown G. La valeur des études de stabilité des médicaments et de leur publication. *The Canadian journal of hospital pharmacy*, 2018). 71(3), P. 163–164.
- [3]. Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007(59): p. 29–37.
- [4].Baertschi SW. *Pharmaceutical Stress Testing*. 1st ed. Dekker M, ed.: Taylor & Francis Group, LLC; 2005.
- [5].International Conference on Harmonisation. *Stability testing of new drug substances and products*. Q1A(R2)
- [6].International Conference on Harmonisation. *Impurities in New Drug Products*. Q3B(R2); 2003.
- [7].International Conference on Harmonisation. *Impurities in New Drug Substances*. Q3A(R2); 2002.
- [8]Breton D, Brezillon C, Buret D, Camarade M, Castel F, Cosledan S, et al. Etudes de dégradation forcée au cours du développement pharmaceutique. *STP Pharma Pratiques*. 2007; 17(2): p. 89-99.
- [9] Bonnes pratiques de fabrication (BPF) des ingrédients pharmaceutiques actifs (IPA) - (GUI-0104)
- [10] Yihong Q, Yisheng C, Lirong L, Geoff GZZ. *Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice*. 1st ed.: Elsevier; 2009.
- [11] International Conference on Harmonisation "Essais de stabilité: Essais de photostabilité des nouveaux produits et substances médicamenteuses" Q1B
- [12] International Conference on Harmonisation: "Spécifications: Procédures d'essai et critères d'acceptation des nouvelles substances et des nouveaux produits médicamenteux: substances" ICH Q6A
- [13] International Conference on Harmonisation. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Q2(R1); 1999.
- [14] International Conference on Harmonisation: "Présence d'impuretés dans les nouveaux produits" ICH Q3B

## RESUME

**Titre :** Etude de stabilité et dosage des produits de dégradation de l'Amoxicilline par chromatographie liquide à haute performance dans une forme pharmaceutique Orale

**Auteur :** Houda ATTJIOUI

**Mots Clés :** Validation, amoxicilline, HPLC, suspension buvable, Méthode

Le développement et la validation des méthodes analytiques pour la recherche et contrôle de ces impuretés sont devenues un concept de base dans les laboratoires de contrôle qualité des médicaments afin de prouver que leurs produits sont stables tout au long du cycle de leur vie. Le présent travail a pour objectif d'étudier le comportement d'une molécule chimique, à l'état de matière première et à l'état de produit fini, sous l'effet de différents types de stress et ensuite de décrire les modalités de validation analytique de la méthode de recherche des produits de dégradation de cette molécule dans une poudre pour suspension buvable par HPLC

L'étude de la dégradation forcée dans des conditions de stress a permis de déterminer la sensibilité de l'amoxicilline à la dégradation en milieu basique et acide, par conséquent, il est impératif d'éviter les excipients basiques et acides lors de la formulation. Sa sensibilité à l'oxydation, l'introduction d'antioxydant dans la formulation peut s'avérer être une bonne stratégie pour la stabilisation de la molécule. L'amoxicilline est également sensible à la chaleur avec le temps. On peut donc postuler que les conditions de stockage du PF devraient éviter son exposition à une température élevée. Le test de stress de l'amoxicilline a engendré quatre impuretés dont deux sont majeures à des taux importants. Ce qui confirme que le test de stress génère des produits de dégradation potentiels. De ce fait vient l'intérêt du développement d'une méthode analytique permettant de détecter un large éventail de ces impuretés et appropriée à une substance donnée. La méthode du dosage et de la recherche des impuretés de l'amoxicilline choisie a été validée conformément à l'approche de l'ICH Q2 avec des points suivants : La méthode du dosage des impuretés et produits de dégradation est : Spécifique, Linéaire, exacte et fidèle dans un intervalle de 80% à 120% de la concentration analysée, Robuste vis-à-vis aux variations des conditions chromatographiques de débit et température.

## Summary

**Title:** Stability study and determination of Amoxicillin degradation product by high performance liquid chromatography in an oral pharmaceutical form

**Author :** Houda ATTJIOUI

**Keywords :** Validation, amoxicillin, HPLC, oral suspension, Method

The development and validation of analytical methods for the investigation and control of these impurities has become a basic concept in drug quality control laboratories in order to prove that their products are stable throughout their life cycle. The objective of the present work is to study the behavior of a chemical molecule, in the raw material state and in the finished product state, under the effect of different types of stress and then to describe the modalities of analytical validation of the method of research of the degradation products of this molecule in a powder for drinkable suspension by HPLC.

The study of forced degradation under different stress conditions allowed to determine the sensitivity of amoxicillin to degradation in basic and acidic media, therefore, it is imperative to avoid basic and acidic excipients during formulation. Due to its sensitivity to oxidation, the introduction of antioxidant in the formulation can be a good strategy for the stabilization of the molecule. Amoxicillin is also sensitive to heat over time. Therefore, it can be postulated that the storage conditions of PF should avoid its exposure to high temperature. The stress test for amoxicillin resulted in four impurities, two of which are major at significant levels. This confirms that the stress test generates potential degradation products. From this fact comes the interest of developing an analytical method allowing to detect a wide range of these impurities and appropriate to a given substance. The selected method for the determination and detection of impurities and degradation products of amoxicillin was validated according to the ICH Q2 approach in view of the following points The analytical method for the determination of impurities and degradation products is: Specific, Linear, accurate and faithful within a range of 80% to 120% of the analyzed concentration, Robust with respect to variations in chromatographic conditions of flow and temperature.

العنوان: دراسة الاستقرار وتحديد نواتج تحلل الأموكسيسيلين بواسطة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء في شكل جرعات فموية

المؤلف: هدى التجوي

الكلمات المفتاحية: المصادقة ، الأموكسيسيلين ، HPLC ، المعلق الفموي ، الطريقة

أصبح تطوير والتحقق من صحة الأساليب التحليلية للبحث والتحكم في هذه الشوائب مفهوماً أساسياً في مختبرات مراقبة جودة الأدوية من أجل إثبات أن منتجاتها مستقرة طوال دورة حياتها. الهدف من هذا العمل هو دراسة سلوك جزيء كيميائي ، سواء كمواد خام أو كمنتج نهائي ، تحت تأثير أنواع مختلفة من الإجهاد ثم وصف طرق التحقق من الصحة بطريقة تحليلية للكشف عن نواتج التحلل هذا الجزيء في مسحوق للتعليق الفموي بواسطة HPLC

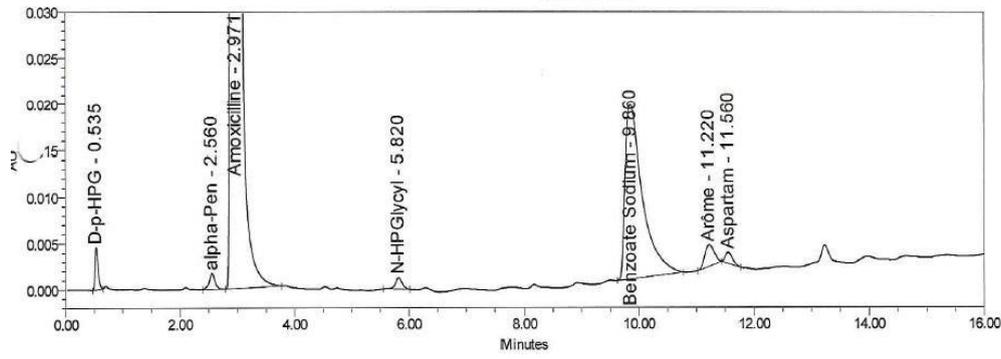
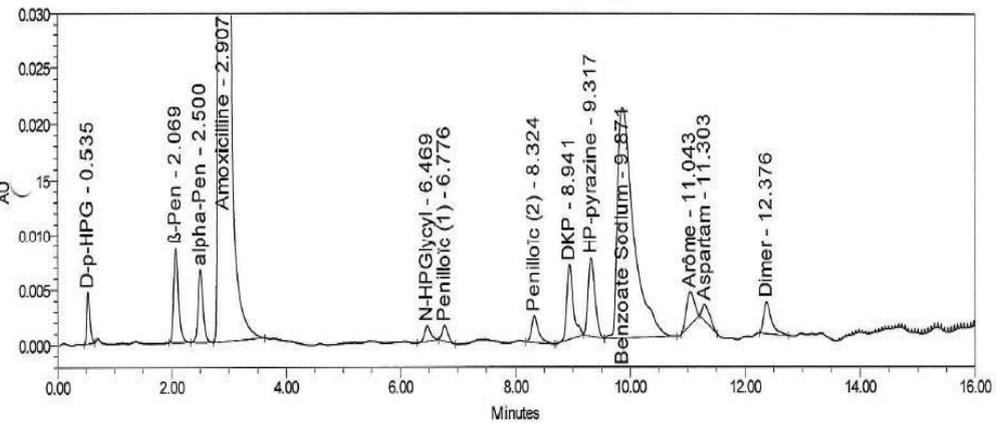
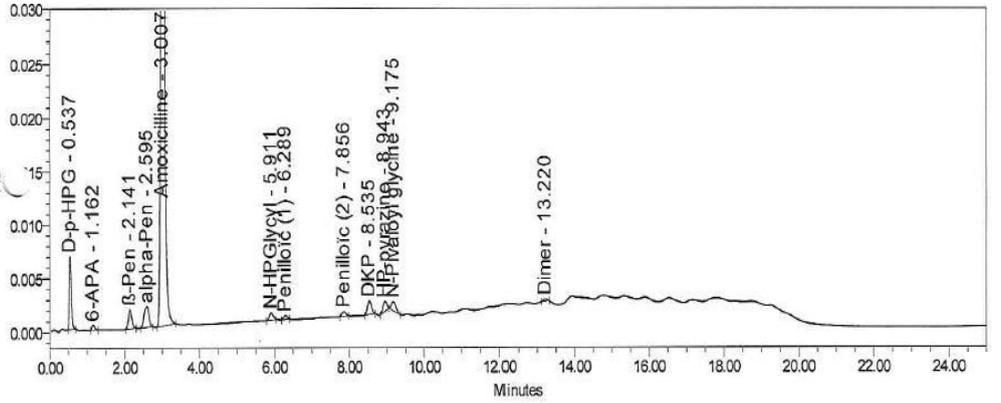
حددت دراسة التحلل القسري تحت ظروف الإجهاد حساسية الأموكسيسيلين للتحلل في الوسط الأساسي والحمضي ، لذلك من الضروري تجنب السواغات الأساسية والحمضية أثناء التركيب. قد تكون حساسيته للأكسدة ، وإدخال مضادات الأكسدة في المستحضر استراتيجية جيدة لتثبيت الجزيء.

الأموكسيسيلين حساس أيضاً للحرارة بمرور الوقت. لذلك يمكن افتراض أن ظروف تخزين PF يجب أن تتجنب تعرضها لدرجة حرارة عالية. أنتج اختبار إجهاد الأموكسيسيلين أربعة شوائب ، اثنان منها كبيرتان عند مستويات كبيرة. هذا يؤكد أن اختبار الإجهاد يولد نواتج تدهور محتملة. ومن هنا يأتي الاهتمام بتطوير طريقة تحليلية تسمح باكتشاف مجموعة واسعة من هذه الشوائب وتكون مناسبة لمادة معينة. تم التحقق من صحة طريقة تحديد الشوائب والبحث عنها في الأموكسيسيلين المحدد وفقاً لنهج ICH Q2 في ضوء النقاط التالية: طريقة تحديد الشوائب ونواتج التحلل هي: محدد ، خطي ، دقيق ومخلص في فترة 80% إلى 120% من التركيز الذي تم تحليله ، قوي فيما يتعلق بتغيرات الظروف الكروماتوغرافية للتدفق ودرجة الحرارة.

## ANNEXE :

### Chromatogrammes du test de spécificité

Solution	Chromatogrammes
Blanc	<p>Chromatogramme de la solution blanche. L'axe des ordonnées (AU) varie de -0.002 à 0.014. L'axe des abscisses (Minutes) varie de 0.00 à 15.00. La ligne de base est stable et proche de 0.000.</p>
Solution standard	<p>Chromatogramme de la solution standard. L'axe des ordonnées (AU) varie de 0.00 à 0.10. L'axe des abscisses (Minutes) varie de 0.00 à 24.00. Un seul pic est visible, étiqueté 'Amoxicilline - 2.056'.</p>
Solution mélange d'impuretés	<p>Chromatogramme du mélange d'impuretés. L'axe des ordonnées (AU) varie de 0.000 à 0.030. L'axe des abscisses (Minutes) varie de 0.00 à 16.00. Plusieurs pics sont identifiés :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>D-p-HPG - 0.542</li> <li>β-APA - 1.161</li> <li>β-Pen - 2.141</li> <li>alpha-Pen - 2.597</li> <li>Amoxicilline - 3.024</li> <li>N-HPGlycyl - 5.909</li> <li>Penilloic(1) - 6.284</li> <li>Penilloic(2) - 7.865</li> <li>DKP - 8.546</li> <li>HP-Pyrazinone - 8.926</li> <li>HP-Valcylglycine - 9.121</li> <li>Dimer - 13.288</li> </ul>
Mélange du placebo	<p>Chromatogramme du mélange placebo. L'axe des ordonnées (AU) varie de 0.000 à 0.030. L'axe des abscisses (Minutes) varie de 0.00 à 16.00. Deux pics sont identifiés :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Benzoate Sodium - 8.863</li> <li>Aspartame - 11.195</li> <li>Aspartame - 11.532</li> </ul>

Solution	Chromatogrammes
Solution Essai	 <p>Chromatogram of Solution Essai showing peaks at the following retention times (minutes):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>D-p-HPG - 0.535</li> <li>alpha-Pen - 2.560</li> <li>Amoxicilline - 2.971</li> <li>N-HPGlycyl - 5.820</li> <li>Benzoate Sodium - 9.860</li> <li>Arôme - 11.220</li> <li>Aspartam - 11.560</li> </ul>
Solution Essai dopé	 <p>Chromatogram of Solution Essai dopé showing peaks at the following retention times (minutes):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>D-p-HPG - 0.535</li> <li>β-Pen - 2.069</li> <li>alpha-Pen - 2.500</li> <li>Amoxicilline - 2.907</li> <li>N-HPGlycyl - 6.469</li> <li>Penilloic (1) - 6.776</li> <li>Penilloic (2) - 8.324</li> <li>DKP - 8.941</li> <li>HP-pyrazine - 9.317</li> <li>Benzoate Sodium - 9.874</li> <li>Arôme - 11.043</li> <li>Aspartam - 11.303</li> <li>Dimer - 12.376</li> </ul>
Solution pour système de suitabilité	 <p>Chromatogram of Solution pour système de suitabilité showing peaks at the following retention times (minutes):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>D-p-HPG - 0.537</li> <li>6-APA - 1.162</li> <li>β-Pen - 2.141</li> <li>alpha-Pen - 2.595</li> <li>Amoxicilline - 3.007</li> <li>N-HPGlycyl - 5.911</li> <li>Penilloic (1) - 6.289</li> <li>Penilloic (2) - 7.856</li> <li>DKP - 8.535</li> <li>HP-pyrazine - 8.943</li> <li>Dimer - 13.220</li> </ul>