

**DÉVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE MÉTHODE DE
DOSAGE DE L'AZITHROMYCINE PAR
CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE A HAUTE
PERFORMANCE (HPTLC) : VALIDATION SELON LE
CONCEPT DU PROFIL D'EXACTITUDE**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mlle. Sara ZIRAOU

Né le 23 septembre 1986 à Kénitra

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : HPTLC, azithromycine, validation, profil d'exactitude

MEMBRES DE JURY

M. Yahya CHERRAH

Professeur de pharmacologie

PRESIDENT

M. Abdelaziz BOUKLOUZE

Professeur des applications pharmaceutiques

RAPPORTEUR

M. Mustapha DRAOUI

Professeur de chimie analytique

M. MY. Abbes FAOUZI

Professeur de pharmacologie

JUGES

Pr. A. BOUKLOUZE
Applications Pharmaceutiques
Faculté de Médecine et de Pharmacie
Rabat - Institut

﴿سُبْحَانَكَ﴾

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِكَ مَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ ﴿٣٢﴾

(البقرة: من الآية 32)



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 - 1969 : Docteur Abdelmalek FARAJ
1969 - 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 - 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 - 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 - 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 - 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Ali BENOMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3. Pr. EL KHAMLIHI Abdeslam Neurochirurgie

4. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid Cardiologie
6. Pr. EL MANOUAR Mohamed Traumatologie-Orthopédie
7. Pr. HAMANI Ahmed* Cardiologie
8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
9. Pr. SBIHI Ahmed Anesthésie - Réanimation
10. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

11. Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
12. Pr. BENOMAR M'hammed Chirurgie-Cardio-Vasculaire

13. Pr. BENSOUDA
14. Pr. BENOSMAN Abdellatif
15. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma

Mohamed Anatomie
Chirurgie Thoracique
Physiologie

Novembre 1983

16. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*
17. Pr. BALAFREJ Amina
18. Pr. BELLAKHDAR Fouad
19. Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia
20. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Neurochirurgie
Rhumatologie
Cardiologie

Décembre 1984

21. Pr. BOUCETTA Mohamed*
22. Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil
23. Pr. MAAOUNI Abdelaziz
24. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
25. Pr. NAJI M'Barek *
26. Pr. SETTAF Abdellatif

Neurochirurgie
Radiothérapie
Médecine Interne
Anesthésie -Réanimation
Immuno-Hématologie
Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

27. Pr. BENJELLOUN Halima
28. Pr. BENSaid Younes
29. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa
30. Pr. IHRAI Hssain *
31. Pr. IRAQI Ghali
32. Pr. KZADRI Mohamed

Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
Pneumo-phtisiologie
Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

33. Pr. AJANA Ali
34. Pr. AMMAR Fanid Pathologie
35. Pr. CHAHED OUAZZANI Houria ép.TAOBANE
36. Pr. EL FASSY FIHRI Mohamed Taoufiq
37. Pr. EL HAITEM Naïma
38. Pr. EL MANSOURI Abdellah*
39. Pr. EL YAACOUBI Moradh
40. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
41. Pr. LACHKAR Hassan
42. Pr. OHAYON Victor*
43. Pr. YAHYAOUI Mohamed

Radiologie
Chirurgicale
Gastro-Entérologie
Pneumo-phtisiologie
Cardiologie
Chimie-Toxicologie Expertise
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1988

44. Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib
45. Pr. DAFIRI Rachida
46. Pr. FAIK Mohamed
47. Pr. HERMAS Mohamed
48. Pr. TOLOUNE Farida*

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

49. Pr. ADN AOUI Mohamed

Médecine Interne

50. Pr. AOUNI Mohamed
51. Pr. BENAMEUR Mohamed*
52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali
53. Pr. CHAD Bouziane
54. Pr. CHKOFF Rachid
55. Pr. FARCHADO Fouzia ép. BENABDELLAH
56. Pr. HACHIM Mohammed*
57. Pr. HACHIMI Mohamed
58. Pr. KHARBACH Aïcha
59. Pr. MANSOURI Fatima
60. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda
61. Pr. SEDRATI Omar*
62. Pr. TAZI Saoud Anas

Février Avril Juillet et Décembre 1991

63. Pr. AL HAMANY Zaitounia
64. Pr. ATMANI Mohamed*
65. Pr. AZZOUZI Abderrahim
66. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM
67. Pr. BELKOUCHI Abdelkader
68. Pr. BENABDELLAH Chahrazad
69. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif
70. Pr. BENSOUDA Yahia
71. Pr. BERRAHO Amina
72. Pr. BEZZAD Rachid
73. Pr. CHABRAOUI Layachi
74. Pr. CHANA El Houssaine*
75. Pr. CHERRAH Yahia
76. Pr. CHOKAIRI Omar
77. Pr. FAJRI Ahmed*
78. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*
79. Pr. KHATTAB Mohamed
80. Pr. NEJMI Maati
81. Pr. OUAALINE Mohammed*
82. Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH
83. Pr. TAOUFIK Jamal

Décembre 1992

84. Pr. AHALLAT Mohamed
85. Pr. BENOUDA Amina
86. Pr. BENSOUDA Adil
87. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
88. Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
89. Pr. CHRAIBI Chafiq
90. Pr. DAOUDI Rajae
91. Pr. DEHAYNI Mohamed*
92. Pr. EL HADDOURY Mohamed
93. Pr. EL OUAHABI Abdessamad
94. Pr. FELLAT Rokaya
95. Pr. GHAFIR Driss*
96. Pr. JIDDANE

Médecine Interne
Radiologie
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Pathologie Chirurgicale
Pédiatrique
Médecine-Interne
Urologie
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Neurologie
Dermatologie
Anesthésie Réanimation

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chirurgie Générale
Hématologie
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Ophtalmologie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Anesthésie-Réanimation
Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
Pharmacologie
Chimie thérapeutique

Chirurgie Générale
Microbiologie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Anesthésie Réanimation
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Mohamed Anatomie

97. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
 98. Pr. TAGHY Ahmed
 99. Pr. ZOUHDI Mimoun

Gynécologie Obstétrique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie

Mars 1994

100. Pr. AGNAOU Lahcen
 101. Pr. AL BAROUDI Saad
 102. Pr. BENCHERIFA Fatiha
 103. Pr. BENJAAFAR Noureddine
 104. Pr. BENJELLOUN Samir
 105. Pr. BEN RAIS Nozha
 106. Pr. CAOUI Malika
 107. Pr. CHRAIBI Abdelmjid
 108. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT
 109. Pr. EL AOUAD Rajae
 110. Pr. EL BARDOUNI Ahmed
 111. Pr. EL HASSANI My Rachid
 112. Pr. EL IDRISSI LAMGHARI Abdennaceur
 113. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*
 114. Pr. ERROUGANI Abdelkader
 115. Pr. ESSAKALI Malika
 116. Pr. ETTAYEBI Fouad
 117. Pr. HADRI Larbi*
 118. Pr. HASSAM Badredine
 119. Pr. IFRINE Lahssan
 120. Pr. JELTHI Ahmed
 121. Pr. MAHFOUD Mustapha
 122. Pr. MOUDENE Ahmed*
 123. Pr. OULBACHA Said
 124. Pr. RHRAB Brahim
 125. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR
 126. Pr. SLAOUI Anas

Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Ophtalmologie
 Radiothérapie
 Chirurgie Générale
 Biophysique
 Biophysique
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Gynécologie Obstétrique
 Immunologie
 Traumato-Orthopédie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Chirurgie Cardio- Vasculaire
 Chirurgie Générale
 Immunologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Médecine Interne
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique
 Traumatologie - Orthopédie
 Traumatologie- Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie -Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

127. Pr. ABBAR Mohamed*
 128. Pr. ABDELHAK M'barek
 129. Pr. BELAIDI Halima
 130. Pr. BRAHMI Rida Slimane
 131. Pr. BENTAHILA Abdelali
 132. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
 133. Pr. BERRADA Mohamed Saleh
 134. Pr. CHAMI Ilham
 135. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
 136. Pr. EL ABBADI Najia
 137. Pr. HANINE Ahmed*
 138. Pr. JALIL Abdelouahed
 139. Pr. LAKHDAR Amina
 140. Pr. MOUANE Nezha

Urologie
 Chirurgie - Pédiatrique
 Neurologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Gynécologie - Obstétrique
 Traumatologie - Orthopédie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Neurochirurgie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie

Mars 1995

- 141. Pr. ABOUQUAL Redouane
- 142. Pr. AMRAOUI Mohamed
- 143. Pr. BAIDADA Abdelaziz
- 144. Pr. BARGACH Samir
- 145. Pr. BEDDOUCHE Amokrane*
- 146. Pr. BENAZZOUZ Mustapha
- 147. Pr. CHAARI Jilali*
- 148. Pr. DIMOU M'barek*
- 149. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*
- 150. Pr. EL MESNAOUI Abbas
- 151. Pr. ESSAKALI HOUSSEINI Leila
- 152. Pr. FERHATI Driss
- 153. Pr. HASSOUNI Fadil
- 154. Pr. HDA Abdelhamid*
- 155. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
- 156. Pr. IBRAHIMY Wafaa
- 157. Pr. MANSOURI Aziz
- 158. Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
- 159. Pr. RZIN Abdelkader*
- 160. Pr. SEFIANI Abdelaziz
- 161. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Urologie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Gynécologie Obstétrique
Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
Cardiologie
Urologie
Ophtalmologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

- 162. Pr. AMIL Touriya*
- 163. Pr. BELKACEM Rachid
- 164. Pr. BELMAHI Amin
- 165. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
- 166. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
- 167. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*
- 168. Pr. GAOUZI Ahmed
- 169. Pr. MAHFOUDI M'barek*
- 170. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
- 171. Pr. MOHAMMADI Mohamed
- 172. Pr. MOULINE Soumaya
- 173. Pr. OUADGHIRI Mohamed
- 174. Pr. OUZEDDOUN Naima
- 175. Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Chirurgie réparatrice et plastique
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Parasitologie
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumo-phtisiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Novembre 1997

- 176. Pr. ALAMI Mohamed Hassan
- 177. Pr. BEN AMAR Abdesslem
- 178. Pr. BEN SLIMANE Lounis
- 179. Pr. BIROUK Nazha
- 180. Pr. BOULAICH Mohamed
- 181. Pr. CHAOUIR Souad*
- 182. Pr. DERRAZ Said
- 183. Pr. ERREIMI Naima
- 184. Pr. FELLAT Nadia
- 185. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
- 186. Pr. HAIMEUR Charki*

Gynécologie-Obstétrique
Chirurgie Générale
Urologie
Neurologie
O.R.L.
Radiologie
Neurochirurgie
Pédiatrie
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie Réanimation

187. Pr. KANOUNI NAWAL
188. Pr. KOUTANI Abdellatif
189. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
190. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
191. Pr. NAZI M'barek*
192. Pr. OUAHABI Hamid*
193. Pr. SAFI Lahcen*
194. Pr. TAOUFIQ Jallal
195. Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Physiologie
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Cardiologie
Neurologie
Anesthésie Réanimation
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

196. Pr. AFIFI RAJAA
197. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*
198. Pr. ALOUANE Mohammed*
199. Pr. BENOMAR ALI
200. Pr. BOUGTAB Abdesslam
201. Pr. ER RIHANI Hassan
202. Pr. EZZAITOUNI Fatima
203. Pr. KABBAJ Najat
204. Pr. LAZRAK Khalid (M)

Gastro-Entérologie
Pneumo-phtisiologie
Oto-Rhino-Laryngologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Radiologie
Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

205. Pr. BENKIRANE Majid*
206. Pr. KHATOURI ALI*
207. Pr. LABRAIMI Ahmed*

Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

208. Pr. ABID Ahmed*
209. Pr. AIT OUMAR Hassan
210. Pr. BENCHERIF My Zahid
211. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd
212. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
213. Pr. CHAOUI Zineb
214. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
215. Pr. ECHARRAB El Mahjoub
216. Pr. EL FTOUH Mustapha
217. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
218. Pr. EL OTMANYAzzedine
219. Pr. GHANNAM Rachid
220. Pr. HAMMANI Lahcen
221. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
222. Pr. ISMAILI Hassane*
223. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
224. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
225. Pr. TACHINANTE Rajae
226. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

227. Pr. AIDI Saadia
228. Pr. AIT OURHROUI Mohamed
229. Pr. AJANA Fatima Zohra

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie

- 230. Pr. BENAMR Said
- 231. Pr. BENCHEKROUN Nabiha
- 232. Pr. CHERTI Mohammed
- 233. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
- 234. Pr. EL HASSANI Amine
- 235. Pr. EL IDGHIRI Hassan
- 236. Pr. EL KHADER Khalid
- 237. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
- 238. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
- 239. Pr. HSSAIDA Rachid*
- 240. Pr. LACHKAR Azzouz
- 241. Pr. LAHLOU Abdou
- 242. Pr. MAFTAH Mohamed*
- 243. Pr. MAHASSINI Najat
- 244. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
- 245. Pr. NASSIH Mohamed*
- 246. Pr. ROUIMI Abdelhadi

Décembre 2001

- 247. Pr. ABABOU Adil
- 248. Pr. AOUAD Aicha
- 249. Pr. BALKHI Hicham*
- 250. Pr. BELMEKKI Mohammed
- 251. Pr. BENABDELJIL Maria
- 252. Pr. BENAMAR Loubna
- 253. Pr. BENAMOR Jouda
- 254. Pr. BENELBARHDADI Imane
- 255. Pr. BENNANI Rajae
- 256. Pr. BENOUACHANE Thami
- 257. Pr. BENYOUSSEF Khalil
- 258. Pr. BERRADA Rachid
- 259. Pr. BEZZA Ahmed*
- 260. Pr. BOUCHIKHI IDRIS Med Larbi
- 261. Pr. BOUHOUC Rachida
- 262. Pr. BOUMDIN El Hassane*
- 263. Pr. CHAT Latifa
- 264. Pr. CHELLAOUI Mounia
- 265. Pr. DAALI Mustapha*
- 266. Pr. DRISSE Sidi Mourad*
- 267. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira
- 268. Pr. EL HIJRI Ahmed
- 269. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
- 270. Pr. EL MADHI Tarik
- 271. Pr. EL MOUSSAIF Hamid
- 272. Pr. EL OUNANI Mohamed
- 273. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil
- 274. Pr. ETTAIR Said
- 275. Pr. GAZZAZ Miloudi*
- 276. Pr. GOURINDA Hassan
- 277. Pr. HRORA Abdelmalek
- 278. Pr. KABBAJ Saad

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

Anesthésie-Réanimation
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Ophtalmologie
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Rhumatologie
Anatomie
Cardiologie
Radiologie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Pédiatrie
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation

279. Pr. KABIRI EL Hassane*
280. Pr. LAMRANI Moulay Omar
281. Pr. LEKEHAL Brahim
282. Pr. MAHASSIN Fattouma*
283. Pr. MEDARHRI Jalil
284. Pr. MIKDAME Mohammed*
285. Pr. MOHSINE Raouf
286. Pr. NABIL Samira
287. Pr. NOUINI Yassine
288. Pr. OUALIM Zouhir*
289. Pr. SABBABH Farid
290. Pr. SEFIANI Yasser
291. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia
292. Pr. TAZI MOUKHA Karim

Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Urologie
 Néphrologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie
 Urologie

Décembre 2002

293. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
294. Pr. AMEUR Ahmed *
295. Pr. AMRI Rachida
296. Pr. AOURARH Aziz*
297. Pr. BAMOU Youssef *
298. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
299. Pr. BENBOUAZZA Karima
300. Pr. BENZEKRI Laila
301. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
302. Pr. BERNOUSSI Zakiya
303. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya
304. Pr. CHOHO Abdelkrim *
305. Pr. CHKIRATE Bouchra
306. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
307. Pr. EL ALJ Haj Ahmed
308. Pr. EL BARNOUSSI Leila
309. Pr. EL HAOURI Mohamed *
310. Pr. EL MANSARI Omar*
311. Pr. ES-SADEL Abdelhamid
312. Pr. FILALI ADIB Abdelhai
313. Pr. HADDOUR Leila
314. Pr. HAJJI Zakia
315. Pr. IKEN Ali
316. Pr. ISMAEL Farid
317. Pr. JAAFAR Abdeloihab*
318. Pr. KRIOULE Yamina
319. Pr. LAGHMARI Mina
320. Pr. MABROUK Hfid*
321. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
322. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
323. Pr. MOUSTAINE My Rachid
324. Pr. NAITLHO Abdelhamid*
325. Pr. OUJILAL Abdelilah
326. Pr. RACHID Khalid *
327. Pr. RAISS Mohamed

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Rhumatologie
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Urologie
 Gynécologie Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Traumatologie Orthopédie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale

- 328. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
- 329. Pr. RHOU Hakima
- 330. Pr. SIAH Samir *
- 331. Pr. THIMOU Amal
- 332. Pr. ZENTAR Aziz*
- 333. Pr. ZRARA Ibtisam*

Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

- 334. Pr. ABDELLAH El Hassan
- 335. Pr. AMRANI Mariam Anatomie
- 336. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
- 337. Pr. BENKIRANE Ahmed*
- 338. Pr. BENRAMDANE Larbi*
- 339. Pr. BOUGHALEM Mohamed*
- 340. Pr. BOULAADAS Malik
- 341. Pr. BOURAZZA Ahmed*
- 342. Pr. CHAGAR Belkacem*
- 343. Pr. CHERRADI Nadia
- 344. Pr. EL FENNI Jamal*
- 345. Pr. EL HANCHI ZAKI
- 346. Pr. EL KHORASSANI Mohamed
- 347. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
- 348. Pr. HACHI Hafid
- 349. Pr. JABOUIRIK Fatima
- 350. Pr. KARMANE Abdelouahed
- 351. Pr. KHABOUZE Samira
- 352. Pr. KHARMAZ Mohamed
- 353. Pr. LEZREK Mohammed*
- 354. Pr. MOUGHIL Said
- 355. Pr. NAOUMI Asmae*
- 356. Pr. SAADI Nozha
- 357. Pr. SASSENOU ISMAIL*
- 358. Pr. TARIB Abdelilah*
- 359. Pr. TIJAMI Fouad
- 360. Pr. ZARZUR Jamila

Ophtalmologie
Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Chimie Analytique
Anesthésie Réanimation
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Traumatologie Orthopédie
Urologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Gastro-Entérologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Janvier 2005

- 361. Pr. ABBASSI Abdellah
- 362. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
- 363. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
- 364. Pr. ALLALI Fadoua
- 365. Pr. AMAR Yamama
- 366. Pr. AMAZOUZI Abdellah
- 367. Pr. AZIZ Noureddine*
- 368. Pr. BAHIRI Rachid
- 369. Pr. BARKAT Amina
- 370. Pr. BENHALIMA Hanane
- 371. Pr. BENHARBIT Mohamed
- 372. Pr. BENYASS Aatif

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Néphrologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
Ophtalmologie
Cardiologie

373. Pr. BERNOUSSI Abdelghani
374. Pr. BOUKLATA Salwa
375. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
376. Pr. DOUDOUH Abderrahim*
377. Pr. EL HAMZAOUI Sakina
378. Pr. HAJJI Leila
379. Pr. HESSISSEN Leila
380. Pr. JIDAL Mohamed*
381. Pr. KARIM Abdelouahed
382. Pr. KENDOSSI Mohamed*
383. Pr. LAAROUSSI Mohamed
384. Pr. LYAGOURI Mohammed
385. Pr. NIAMANE Radouane*
386. Pr. RAGALA Abdelhak
387. Pr. SBIHI Souad
388. Pr. TNACHERI OUZZANI Btissam
389. Pr. ZERAIDI Najia

Ophtalmologie
Radiologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie
Pédiatrie
Radiologie
Ophtalmologie
Cardiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*
424. Pr. AFIFI Yasser
425. Pr. AKJOUJ Said*
426. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra
427. Pr. BELMEKKI Abdelkader*
428. Pr. BENCHEIKH Razika
429. Pr. BIYI Abdelhamid*
430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*
432. Pr. CHEIKHAOUI Younes
433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
434. Pr. DOGHMI Nawal
435. Pr. ESSAMRI Wafaa
436. Pr. FELLAT Btissam
437. Pr. FAROUDY Mamoun
438. Pr. GHADOUANE Mohammed*
439. Pr. HARMOUCHE Hicham
440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
441. Pr. IDRIS LAHLOU Amine
442. Pr. JROUNDI Laila
443. Pr. KARMOUNI Tariq
444. Pr. KILI Amina
445. Pr. KISRA Hassan
446. Pr. KISRA Mounir
447. Pr. KHARCHAFI Aziz*
448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*
449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*
450. Pr. MANSOURI Hamid*
451. Pr. NAZIH Naoual
452. Pr. OUANASS Abderrazzak
453. Pr. SAFI Soumaya*
454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra

Rhumatologie
Dermatologie
Radiologie
Dermatologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio - Vasculaire
Chirurgie Cardio - Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Gastro-entérologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie - Pédiatrique
Médecine Interne
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
O.R.L
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie

- 455. Pr. SEFIANI Sana
- 456. Pr. SOUALHI Mouna
- 457. Pr. TELLAL Saida*
- 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

Anatomie Pathologique
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

- 458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila
- 459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
- 460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
- 461. Pr. LALAOU SALIM Jaafar *
- 462. Pr. BAITE Abdelouahed *
- 463. Pr. TOUATI Zakia
- 464. Pr. OUZZIF Ez zohra *
- 465. Pr. BALOUCH Lhousaine *
- 466. Pr. SELKANE Chakir *
- 467. Pr. EL BEKKALI Youssef *
- 468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *
- 469. Pr. EL ABSI Mohamed
- 470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
- 471. Pr. ACHOUR Abdessamad *
- 472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq *
- 473. Pr. GHARIB Nouredine
- 474. Pr. TABERKANET Mustafa *
- 475. Pr. ISMAILI Nadia
- 476. Pr. MASRAR Azlarab
- 477. Pr. RABHI Monsef *
- 478. Pr. MRABET Mustapha *
- 479. Pr. SEKHSOKH Yessine *
- 480. Pr. SEFFAR Myriame
- 481. Pr. LOUZI Lhoussain *
- 482. Pr. MRANI Saad *
- 483. Pr. GANA Rachid
- 484. Pr. ICHOU Mohamed *
- 485. Pr. TACHFOUTI Samira
- 486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine
- 487. Pr. MELLAL Zakaria
- 488. Pr. AMMAR Haddou *
- 489. Pr. AOUFI Sarra
- 490. Pr. TLIGUI Houssain
- 491. Pr. MOUTAJ Redouane *
- 492. Pr. ACHACHI Leila
- 493. Pr. MARC Karima
- 494. Pr. BENZIANE Hamid *
- 495. Pr. CHERKAOUI Naoual *
- 496. Pr. EL OMARI Fatima
- 497. Pr. MAHI Mohamed *
- 498. Pr. RADOUANE Bouchaib *
- 499. Pr. KEBDANI Tayeb
- 500. Pr. SIFAT Hassan *
- 501. Pr. HADADI Khalid *

Anatomie pathologique
 Anesthésie réanimation
 Anesthésier réanimation
 Anesthésie réanimation
 Anesthésie réanimation
 Cardiologie
 Biochimie
 Biochimie
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie plastique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Dermatologie
 Hématologie biologique
 Médecine interne
 Médecine préventive santé publique
 et hygiène
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Virologie
 Neuro chirurgie
 Oncologie médicale
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 ORL
 Parasitologie
 Parasitologie
 Parasitologie
 Pneumo phtisiologie
 Pneumo phtisiologie
 Pharmacie clinique
 Pharmacie galénique
 Psychiatrie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiothérapie
 Radiothérapie
 Radiothérapie

502. Pr. ABIDI Khalid
 503. Pr. MADANI Naoufel
 504. Pr. TANANE Mansour *
 505. Pr. AMHAJJI Larbi *

Réanimation médicale
 Réanimation médicale
 Traumatologie orthopédie
 Traumatologie orthopédie

Mars 2009

- Pr. BJIJOU Younes
 Pr. AZENDOUR Hicham *
 Pr. BELYAMANI Lahcen *
 Pr. BOUHSAIN Sanae *
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. LAMSAOURI Jamal *
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. AMAHZOUNE Brahim *
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
 Pr. BOUNAIM Ahmed *
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. CHTATA Hassan Toufik *
 Pr. BOUI Mohammed *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. DOGHMI Kamal *
 Pr. ABOUZAHER Ali *
 Pr. ENNIBI Khalid *
 Pr. EL OUENNASS Mostapha
 Pr. ZOUHAIR Said*
 Pr. L'kassimi Hachemi*
 Pr. AKHADDAR Ali *
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AGADR Aomar *
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. BASSOU Driss *
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. KADI Said *

Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Biochimie
 Cardiologie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Dermatologie
 Gastro-entérologie
 Gynécologie obstétrique
 Hématologie biologique
 Hématologie biologique
 Hématologie clinique
 Médecine interne
 Médecine interne
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Neuro-chirurgie
 Neurologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pneumo-phtisiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Rhumatologie
 Traumatologie orthopédique
 Traumatologie orthopédique

Octobre 2010

- Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. CHERRADI Ghizlan

Médecine interne
 Gastro entérologie
 Cardiologie

Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. KANOUNI Lamya
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. MALIH Mohamed*
 Pr. BOUSSIF Mohamed*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. RAISSOUNI Zakaria*
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. LEZREK Mounir
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. ZOUAIDIA Fouad
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. CHADLI Mariama*

Anesthésie Réanimation
 Anesthésie réanimation
 Radiothérapie
 Radiologie
 Radiologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Médecine aérologique
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Chirurgie pédiatrique
 Urologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 ORL
 Ophtalmologie
 Hématologie
 Anatomie pathologique
 Anatomie pathologique
 Physiologie
 Biochimie chimie
 Microbiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

1. Pr. ABOUDRAR Saadia
2. Pr. ALAMI OUHABI Naima
3. Pr. ALAOUI KATIM
4. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
5. Pr. ANSAR M'hamed
6. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
7. Pr. BOUHOUCHE Ahmed
8. Pr. BOURJOUANE Mohamed
9. Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia
10. Pr. DAKKA Taoufiq
11. Pr. DRAOUI Mustapha
12. Pr. EL GUESSABI Lahcen
13. Pr. ETTAIB Abdelkader
14. Pr. FAOUZI Moulay El Abbes
15. Pr. HMAMOUCHE Mohamed
16. Pr. IBRAHIMI Azeddine
17. Pr. KABBAJ Ouafae
18. Pr. KHANFRI Jamal Eddine
19. Pr. REDHA Ahlam
20. Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
21. Pr. TOUATI Driss
22. Pr. ZAHIDI Ahmed
23. Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
 Biochimie
 Pharmacologie
 Histologie-Embryologie
 Chimie Organique et Pharmacie Chimique
 Applications Pharmaceutiques
 Génétique Humaine
 Microbiologie
 Biochimie
 Physiologie
 Chimie Analytique
 Pharmacognosie
 Zootechnie
 Pharmacologie
 Chimie Organique

Biochimie
 Biologie
 Biochimie
 Chimie Organique
 Pharmacognosie
 Pharmacologie
 Chimie Organique

*** Enseignants Militaires**

Dédicaces



Je dédie cette thèse :

A mes très chers Parents,

Comment parler de moi sans parler de vous, mes chers parents je vous dois tant. Et c'est pour cette raison que je débute en vous remerciant.

Tous les mots ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos encouragements, votre soutien, et vos prières, que je me suis réalisée.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle pour toute l'affection que vous n'avez jamais cessé de me prodiguer.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé et bonheur pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de ma vie.

*A mes très chers frères,
Naoufal, Rabi, Oualid et Adam*

Je ne peux exprimer à travers ces quelques lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Merci pour la joie que vous m'avez procurée et merci infiniment pour votre présence.

Votre aide continue, votre générosité, votre inlassable soutien a toujours été pour moi une source de courage et de confiance. Et pour ceci je ne vous remercierai jamais assez.

Qu'il me soit permis, à travers cet humble travail, de vous assurer ma très grande reconnaissance.

J'implore Dieu le tout puissant, de vous accorder le bonheur et l'aide pour réaliser tous vos vœux. Et Puisse l'amour et la fraternité nous unir à jamais.

A la mémoire de mes défunts grands-parents,

Puisse Dieu tout puissant, vous accorder sa clémence, sa miséricorde, et assurer le repos de vos âmes au sein de son paradis

A mes chers oncles et mes chères tantes,

Veillez percevoir à travers ce travail, l'expression de ma profonde reconnaissance pour toute l'attention dont vous faites preuve à mon égard.

Avec tout l'amour que je vous porte, je vous souhaite santé, bonheur et longue vie.

A mes chers cousins et mes chères cousines,

Merci pour les bons et inoubliables moments qu'on a vécu ensemble. A vos côtés, j'ai connu la joie et l'amusement.

A tous, je dédie ce travail avec tout mon amour et mon estime.

A mes cher(e)s ami(e)s

*Marouane, Karima, hyun Jin Lee, Imane, Achraf, Said,
Zineb, Taha et Mohammed*

Je remercie le bon dieu de m'avoir permis de vous rencontrer et l'implore de vous avoir pour toujours à mes côtés.

Je vous dédie ce travail avec mes sincères remerciements.

*A toutes mes amies et collègues du plateau technique
central de recherche de la faculté de médecine et de
pharmacie de Rabat.*

*Je voudrais pouvoir vous apporter ici la chaleur de mon affection et
de mon amour.*

*Votre aide, votre générosité extrême, votre soutien, étaient pour
moi une source de courage, de conscience et de patience.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, vous combler de santé, de bonheur et
vous procurer longue vie.*

*A tous les professeurs auprès de qui j'ai eu l'honneur
d'apprendre.*

*A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis
involontairement de citer.*

*A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la
réalisation de ce travail.*

*Pour leurs précieuses participations et en témoignage de ma profonde
reconnaissance*

Remerciements



J'adresse mes sincères remerciements :

*A Notre Maître et Président de thèse
Monsieur Yahya CHERRAH
Professeur de pharmacologie*

*Nous vous remercions vivement pour le privilège et l'honneur que
vous nous faites en acceptant de présider notre jury de thèse.*

*Nous vous prions, cher Maître, d'accepter dans ce travail le
témoignage de notre haute considération et de notre sincère respect.*

*A Notre Maître et Rapporteur de thèse
Monsieur Abdelaziz BOUKLOUZE
Professeur des applications pharmaceutiques*

Nous avons eu un grand plaisir à travailler sous votre direction, trouvant auprès de vous le conseiller et le guide qui nous a reçu en toutes circonstances avec sympathie et bienveillance.

Nous avons toujours admiré en vous votre grande compétence, votre dynamisme et votre modestie qui n'ont cessé de susciter notre profond respect.

Nous espérons être à la hauteur de la confiance que vous nous accordez et vous prions, cher Maître, de trouver en ce travail le témoignage de notre sincère reconnaissance et profonde gratitude.

*A Notre Maître et Juge de thèse
Monsieur Mustapha DRAOVI
Professeur de chimie analytique*

*En acceptant de juger ce travail, vous nous accordez un très grand
honneur.*

*Veillez accepter l'expression de notre considération la plus
distinguée.*

*A Notre Maître et Juge de thèse
Monsieur M.Y. Abbes FAOUZI
Professeur de pharmacologie*

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger notre travail.

Veillez trouver ici, l'expression de notre reconnaissance et de nos sincères remerciements.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE: GENERALITES ET PRESENTATION DE LA THESE

PREMIERE PARTIE : PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I: LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE A HAUTE PERFORMANCE (HPTLC)

I. Introduction.....	6
II. Rappels sur la chromatographie sur couche mince (CCM).....	6
II.1. Définition et Principe.....	6
II.2. Phases stationnaires	7
II.3. Phases mobiles.....	7
II.4. Technique de la CCM.....	8
II.4.1. Préparation de l'échantillon.....	8
II.4.2. Dépôt de l'échantillon	8
II.4.3. Développement des plaques	8
II.4.4. Détection des substances séparées.....	9
II.4.5. Identification des substances séparées	9
III. Chromatographie sur couche mince à haute performance	10
III.1. Théorie de séparation basée sur HPTLC.....	10
III.1.1. Efficacité de la séparation	10
III.1.2. Coefficient de partage	12
III.1.3. Rétention / Rapport frontal.....	12
III.1.4. Facteur de capacité	13

III.1.5. Nombre de séparation	14
III.1.6. Hauteur de la plaque.....	15
III.1.7. Résolution.....	17
III.1.8. Sélectivité	19
III.2. Automatisation et aspects expérimentaux de la HPTLC	20
III.2.1. Qualité de la couche adsorbante.....	21
III.2.2. Qualité du dépôt	21
III.2.3. Développement chromatographique	22
III.2.4. Evaluation du chromatogramme	25

CHAPITRE II : LA VALIDATION D'UNE PROCEDURE ANALYTIQUE

I. Introduction	29
II. Définition de la validation	30
III. But de la validation	30
IV. Rappel sur les éléments de validation selon l'approche classique	31
IV.1. Intervalle de dosage	32
IV.2. Spécificité.....	32
IV.3. Linéarité	33
IV.4. Exactitude.....	33
IV.5. Fidélité.....	34
IV.5.1. Répétabilité	34
IV.5.2. Fidélité intermédiaire	35
IV.6. Limite de détection.....	35
IV.6. Limite de quantification.....	36
V. Limites de l'approche classique de la validation	37
VI. Apport de la nouvelle approche SFSTP 2003.....	38

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

I. Introduction.....	44
II. Matériels et méthodes.....	51
II.1. Matériels	51
II.1.1. Matières premières et spécialités pharmaceutiques	51
II.1.2. Réactifs	51
II.1.3. Appareillage.....	52
II.2. Méthodes.....	55
II.2.1. Conditions chromatographiques.....	57
II.2.1.1. Sélection de la phase stationnaire.....	57
II.2.1.2. Préparation de la plaque	57
II.2.1.3. Préparation de la phase mobile.....	57
II.2.1.4. Préparation des solutions.....	58
II.2.1.5. Application des échantillons.....	58
II.2.1.6. Développement chromatographique.....	60
II.2.1.7. Pulvérisation	61
II.2.1.8. Chauffage.....	61
II.2.1.9. Analyse densitométrique et quantification	61
III. Résultats et discussions	61
III.1. Validation selon l'approche classique (ICH 94, SFSTP 92).....	62
III.1.1. Spécificité.....	62
III.1.2. Linéarité.....	63
III.1.3. Fidélité	66
III.1.4. Exactitude	66

III.1.5. Limites de détection et de quantification	67
III.1. Validation selon la nouvelle approche SFSTP 2003.....	69
III.2.1. Stratégie du profil d'exactitude	69
III.2.2. Analyse de la fonction de réponse	700
III.2.3. Résultats de la validation du modèle sélectionné	71
III.2.3.1. Justesse	73
III.2.3.2. Fidélité	73
III.2.3.3. Exactitude.....	74
III.2.3.4. Linéarité	76
III.2.3.5. Limites de détection et de quantification	79
IV. Application de la méthode	79
Conclusion.....	80

CONCLUSION GENERALE

RESUME

REFERENCES

ANNEXES

Liste des tableaux, figures, et abréviations

Liste des tableaux

Tableau N°	Titres	Page N°
1	Tableau comparatif : HPTLC et CCM	27
2	Les critères de validation en fonction de l'objectif de la méthode d'analyse.	31
3	Applications de l'HPTLC pour l'analyse pharmaceutique	50
4	Tableau récapitulatif des spécialités étudiées	51
5	Quantité d'azithromycine en fonction de volume du dépôt.	60
6	Résumé des données d'exactitude	67
7	Justesse de la méthode	73
8	Fidélité de la méthode	74
9	Exactitude de la méthode	75
10	Linéarité de la méthode	77
11	Résultats de la détermination de l'azithromycine dans les formulations pharmaceutiques étudiées.	80

Liste des figures

Figure N°	Titres	Page N°
1	Les paramètres de la CCM utilisés dans le calcul du Rf	13
2	Calcul du nombre de plateaux	16
3	Résolution chromatographique	18
4	Les étapes impliquées dans l'HPTLC	20
5	Influence de la vitesse d'application par pulvérisation	22
6	Processus de développement dans une chambre à double cuve	23
7	Chambre de développement vertical à double compartiments	24
8	Anomalie possible avec les méthodes classiques de validation.	38
9	Représentation graphique de l'exactitude, de la justesse et de la fidélité des résultats d'une méthode d'analyse.	39
10	Profil d'exactitude comme outil de décision	41
11	Structure chimique générale des macrolides	45
12	Structure moléculaire de l'azithromycine	46
13	Le déposeur d'échantillons (ATS 4)	53
14	La chambre de développement automatique (ADC 2)	54
15	Le scanner TLC 3	54
16	La procédure pour l'analyse de l'azithromycine par HPTLC	56
17	Image obtenue grâce au logiciel « wincats » qui montre le positionnement des dépôts appliqués par pulvérisation.	59
18	Chromatogrammes spécifique à l'azithromycine obtenus à partir du SC (a) et du SV (b) à la concentration 1 µg/zone .	62
19	Droite de calibration	63
20	Droites d'étalonnage construites par le modèle quadratique	72
21	Profil d'exactitude obtenu avec un risque de ± 5 , en considérant le modèle de régression polynomial.	75
22	Relation entre les concentrations introduites et les concentrations prédites inverse	76
23	Graphe de la linéarité se rapportant à la méthode de HPTLC pour la détermination de l'azithromycine.	78

Liste des abréviations

CCM	:	Chromatographie sur Couche Mince
TLC	:	Thin-Layer Chromatography
HPTLC	:	High-Performance Thin-Layer Chromatography
AZT	:	Azithromycine
HLPC	:	Chromatographie Liquide à Haute Performance
ICH	:	International Conference on Harmonisation
SFSTP	:	Société française des sciences et techniques pharmaceutiques
UV	:	Ultra-violet
FP	:	Forme Pharmaceutique
PA	:	Principe actif
SV	:	Standard de validation
SC	:	Standard de calibration
LD	:	Limite de détection
LQ	:	Limite de quantification
FI	:	Fidélité intermédiaire
ATS	:	Automatic TLC Sampler / Déposeur automatisé d'échantillons
ADC	:	Automatic Developing Chamber / Chambre de développement automatique
CDC	:	Cuve à double compartiment
AINS	:	Anti-inflammatoire non stéroïdien
SM	:	Mass spectrometry / Spectrométrie de masse
USP	:	United States Pharmacopeia / Pharmacopée américaine
ISO	:	International Organization for Standardization / Organisation internationale de normalisation
FDA	:	Food and Drug Administration
CV	:	Coefficient de variation
IC	:	Intervalle de confiance
IT	:	Intervalle de tolérance
QC	:	Contrôle qualité

INTRODUCTION GENERALE

L'industrie pharmaceutique utilise de façon intensive la majorité des techniques d'analyses reconnues et cela aussi bien dans les phases de recherche et de mise au point de nouvelles molécules que pour le développement de méthodes analytiques destinées au contrôle qualité des médicaments. Pour chaque production, des milliers d'analyses sont réalisées quotidiennement, ces dernières doivent fournir des informations fiables concernant l'identité, la pureté, la teneur et la stabilité des échantillons analysés. Pour cela de nombreuses techniques d'analyses sont disponibles pour assurer la qualité des produits pharmaceutiques. Pour l'utilisation en routine, il est impératif que ces techniques soient aussi rapides et simples à utiliser que possible, tout en conservant une qualité maximale. Nul doute que les laboratoires cherchant aussi à réduire les coûts d'analyse, ainsi que ceux moins bien dotés en instruments de pointe, trouvent dans la chromatographie une méthode ayant beaucoup d'atouts pour des analyses dans le domaine pharmaceutique ou autres.

La chromatographie sur couche mince CCM (TLC pour thin-layer chromatography) représente sans doute l'une des méthodes d'identification les plus simples à réaliser en routine. Cependant, il faut bien admettre qu'elle garde une image de technique désuète, peu fiable et approximative par rapport, en particulier, à la chromatographie en phase liquide.

La mise en œuvre de cette méthode a considérablement évolué ces dernières années. Une instrumentation particulière a été développée aboutissant à une forme plus sophistiquée de la CCM. On parle ainsi de la chromatographie sur

couche mince à haute performance HPTLC (pour High-Performance Thin-Layer Chromatography). A l'heure actuelle, c'est l'une des méthodes d'analyses les plus utilisées. Il a été rapporté dans de nombreuses publications qu'elle fournit une excellente séparation et permet l'analyse qualitative et quantitative d'un large éventail de composés dans plusieurs domaines en particulier l'analyse pharmaceutique, clinique, biologique, agro-alimentaire et environnementale [1].

Cependant, l'importance que représente cette technique constitue la base fondamentale de notre travail dont l'objectif principal est le développement d'une nouvelle méthode basée sur la HPTLC pour le dosage de l'azithromycine. En effet, plusieurs techniques ont été décrites dans la littérature pour l'analyse de ce principe actif, mais elles sont coûteuses et longues, en plus les techniques chromatographiques exigent des dispositifs de détection qui, généralement, ne sont pas disponibles dans les laboratoires d'analyses de routine [2]. Ce qui nous amène à penser à la HPTLC car elle utilise une instrumentation plus simple permettant de réduire le coût et le temps d'analyse.

Dans la pratique courante, après l'étape de développement, il devient de plus en plus évident et essentiel de démontrer au moyen de la validation qu'une méthode correspond à l'usage attendu tout en fournissant des résultats fiables. Pour valider la méthode d'HPTLC développée dans ce travail, nous avons appliqué la stratégie basée sur le profil d'exactitude récemment introduite et décrite dans la littérature [78]. D'un point de vue statistique, cette stratégie de validation répond aux besoins des analystes quant à la prise de décision en rapport avec les résultats fournis et en considérant des limites d'acceptation prédéfinies ainsi que le risque relatif à l'usage futur de la méthode.

Le principe de la validation est largement répandu dans tous les domaines

d'activités où des mesures sont réalisées. Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une pratique réglementaire.

Notre présente thèse consiste alors au développement et à la validation d'une nouvelle méthode de dosage de l'azithromycine par HPTLC conformément aux guidelines en vigueur ICH Q2(R1) et SFSTP 2003 (Profil d'exactitude). Elle s'articule en deux parties : une première partie théorique comportant deux chapitres ; et une deuxième partie expérimentale.

Dans la première partie théorique, nous présenterons tout d'abord une analyse bibliographique portant sur l'HPTLC. Nous nous attacherons à étudier les aspects fondamentaux et expérimentaux conduisant au perfectionnement de l'instrumentalisation et à l'automatisation de la technique.

Les différents critères et méthodologies liés à la validation d'une méthode de dosage seront définis dans le second chapitre.

Notre travail expérimental a pour but de valider la méthode analytique développée. Une première partie introductive sera consacrée aux généralités sur l'azithromycine avec des exemples de quelques méthodes précédemment utilisées pour l'analyse de ce principe dans diverses formes pharmaceutiques.

L'accent est porté par la suite sur les différents domaines d'application ainsi que les principaux travaux de recherche effectués par l'HPTLC.

Ensuite, après avoir détaillé la procédure analytique et les conditions opératoires appliquées à notre étude, nous présenterons et discuterons par la suite les résultats des analyses statistiques obtenus et nous terminerons avec une conclusion.

Enfin, nous retrouverons en annexes l'ensemble des informations nécessaires à une bonne compréhension de ce travail.

A. PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I

La chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC)

I. INTRODUCTION

La CCM (ou TLC dans la terminologie anglo-saxonne) est sans doute l'une des méthodes de séparation les plus polyvalentes et les plus utilisées en chromatographie. Bien qu'elle soit considérée comme technique essentiellement qualitative pour l'analyse des mélanges relativement simples, l'analyse quantitative par CCM a récemment suscité un intérêt considérable en raison de l'amélioration des technologies, ce qui lui a permis de passer du statut de méthode « qualitative ou semi-quantitative » à celui de méthode « quantitative », susceptible de donner des résultats très fiables.

Il s'agit désormais d'une technique instrumentale au même titre que les autres formes de chromatographie. Tout comme le changement du nom de la chromatographie liquide à « chromatographie liquide à haute performance » (HPLC) caractérise le changement significatif dans ses capacités de performance, cette CCM améliorée a été également nommée « chromatographie sur couche mince à haute performance » (HPTLC) par *RE Kaiser* qui a contribué à son développement [3].

II. RAPPELS : LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

II.1. Principe

Le principe de CCM est, comme pour toutes les autres méthodes de chromatographie, un procédé de partage multi-étapes. Ce procédé nécessite un adsorbant (la phase stationnaire), un solvant ou un mélange de solvants (la phase mobile) et le mélange à séparer. L'adsorbant est déposé en couche mince sur un support approprié (plaque de verre, feuille de polyester ou d'aluminium, etc.).

L'élution par la phase mobile permet de séparer les constituants du mélange.

II.2. Phases stationnaires

Les fabricants proposent des couches minces prêtes à l'emploi. La gamme de substances actuellement disponibles comme phase stationnaire s'est considérablement élargie ; Le gel de silice est l'adsorbant le plus utilisé (environ 80% des séparations sont effectuées sur ce type de plaque [1]), Elle est maintenant disponible en plusieurs tailles de particules et en mélange avec une variété de liants auxquels des indicateurs fluorescents peuvent être incorporés. Avec les éluants aqueux, on peut aussi utiliser des matériaux dits à polarité de phase inversée. Il s'agit d'hydrocarbures à longues chaînes de C 10 à C 18 greffés sur le gel de silice par les groupes hydroxyles. Leur utilisation a élargi la gamme de solvants utilisables pour le développement.

II.3. Phases mobiles

La phase mobile peut être constituée d'un ou de plusieurs solvants, elle monte par capillarité le long de la phase stationnaire. Lors du choix de la plaque mobile pour le développement des plaques CCM, il est important de s'assurer que le solvant ne réagit pas chimiquement avec les substances du mélange à analyser. La gamme des solvants s'étend depuis les solvants non polaires, comme l'hexane, jusqu'aux mélanges de solvants polaires, tels que l'éthanol avec des acides organiques. Avec des phases stationnaires polaires, il convient d'utiliser des solvants de polarité moyenne à faible, tandis que les systèmes à phases inversées nécessitent souvent des solvants plus polaires tels que l'eau, l'acétonitrile, le butanol...

II.4. Technique de la CCM

II.4.1. Préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon est en général moins exigeante que dans le cas des autres méthodes chromatographiques. Elle peut se faire en plusieurs étapes (prélèvement, réduction mécanique de l'échantillon, extraction, filtration, éventuellement concentration, ou même pré-séparation en éliminant les composés gênants), suivant le type de séparation désiré.

II.4.2. Dépôt des échantillons

La ligne de dépôts sur laquelle on applique la solution d'échantillon se situe habituellement à environ 2- 2,5 cm du bas de la plaque. On délivre quantitativement des volumes de 1, 2 ou 5 μ l à l'aide d'un instrument approprié (seringue, micropipette...).

II.4.3. Développement des plaques

On réalise généralement un développement linéaire simple : on plonge de 0,5 cm le bas de la plaque dans le solvant de développement. La cuve est, de préférence, tapissée de feuilles de papier filtre plongeant jusqu'au fond dans le solvant, ce qui garantit une atmosphère saturée en sa vapeur. On laisse l'éluant agir jusqu'à ce que le front de la phase mobile ait parcouru la distance requise (habituellement de 10 à 15 cm), on sort alors la plaque de la chambre et on marque le front du solvant. On met la plaque à sécher sous hotte aspirante ou dans une étuve ; les conditions de séchage doivent tenir compte de la sensibilité des différents constituants à la chaleur et à la lumière.

II.4.4. Détection des substances séparées

Il existe plusieurs méthodes pour révéler la position des solutés après séparation. Les substances colorées peuvent être observées directement sur la phase stationnaire, mais les autres sont habituellement révélées en vaporisant sur la plaque un réactif approprié qui fait apparaître les régions où elles se situent sous forme de zones colorées. Certaines substances sont fluorescentes sous éclairage UV et ne nécessitent pas cette opération. On peut utiliser une plaque dont l'adsorbant contient une substance fluorescente (les solutés apparaissent alors à la lumière UV sous formes de tâches sombres sur fond fluorescent). Les tâches ainsi révélées seront marquées au crayon de façon à pouvoir se rappeler leurs positions.

II.4.5. Identification des substances séparées

Les constituants chimiques sont ainsi visualisés sur le chromatogramme et leurs positions sont exprimées en R_f (rapport frontal) [1] :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

(Centre de la substance) (Front du solvant)

La valeur du R_f est comprise entre 0,00 et 1,00. Comme elle est étroitement liée aux conditions opératoires (température, pression, lumière...), elle doit être considérée comme valeur d'orientation. Le R_f étant difficilement reproductible, on identifie la tâche inconnue par comparaison à une solution de référence (solution témoin) de concentration connue et préparée si possible avec le même solvant que la solution à analyser. Les solutions de référence et inconnue étant soumises aux mêmes conditions opératoires, il sera possible d'identifier la tâche inconnue par comparaison du R_f et de la couleur.

III. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE A HAUTE PERFORMANCE

La CCM classique est une technique d'analyse qui nécessite beaucoup de manipulations en raison de nombreuses étapes du protocole expérimental. C'est pour cette raison que l'on s'est efforcé depuis quelques années d'écourter les protocoles et de réduire le temps moyen de traitement de chaque échantillon.

A l'heure actuelle, toutes ces étapes ont été automatisées et exploitées instrumentalement sous forme d'un système moderne d' HPTLC qui permet la manipulation d'un grand nombre d'échantillons sur la même plaque. Une vitesse supérieure de séparation, une sensibilité élevée et des résultats reproductibles résultent de la haute qualité des couches chromatographiques et de l'amélioration de l'instrumentation en continue.

III.1. Théorie de séparation basée sur l'HPTLC

Dans ce chapitre, nous allons discuter la théorie de séparation basée sur l'HPTLC ainsi que les principaux paramètres influençant l'efficacité du système chromatographique avec une référence à la CCM et à la HPTLC en particulier [4].

III.1.1. L'efficacité de la séparation

En CCM, le flux de la phase mobile n'est pas contrôlé comme dans les méthodes chromatographiques utilisant la colonne. La position de la phase mobile au temps (t) lors de son déplacement le long de la couche absorbante est régie par des forces capillaires qui sont décrites par :

$$(Zf)^2 = kt$$

Où Z_f est la distance parcourue par la phase mobile et k est la constante de vitesse.

La constante de vitesse k dépend de plusieurs facteurs externes y compris le niveau de saturation de la vapeur en contact avec la phase stationnaire. Elle est également liée aux propriétés des phases mobile et stationnaire, selon l'équation:

$$k = 2K_o d_p (\gamma/\eta) \cos\theta$$

Où K_o est la constante de perméabilité ;

d_p est le diamètre des particules ;

γ est la tension superficielle de la phase mobile ;

η est la viscosité de la phase mobile ;

θ est l'angle de contact.

Supposant une distribution uniforme de la taille des particules :

1° La constante de vitesse k augmente linéairement avec la taille moyenne des particules, donc pour une couche mince à faible diamètre particulaire, la vitesse de la phase mobile diminue rapidement avec la distance de migration jusqu'à ce qu'elle devienne assez lente pour que la diffusion puisse provoquer l'élargissement des spots.

2° Pour une couche mince à faible diamètre particulaire, il est possible d'obtenir jusqu'à environ 5000 plateaux théoriques avec une longueur de développement de 5-7 cm, alors que pour les couches à diamètre élevé ($d_p = 15 \mu m$), une longueur de développement d'environ 15 cm est nécessaire pour obtenir environ 5000 plateaux théoriques (un nombre de plateau plus élevé est possible, mais cela va conduire à un temps de séparation plus long).

Il est donc inutile d'utiliser des distances de migration supérieures à 5-7 cm pour les plaques d'HPTLC puisque la vitesse de la phase mobile diminue au point où la zone d'élargissement dépasse le taux de la séparation. L'HPTLC nécessite donc une plus courte distance de migration pour obtenir un rendement donné, entraînant des séparations plus rapides et des zones plus compactes facile à détecter par densitométrie.

III.1.2. Coefficient de partage

Au long de son passage à travers le système chromatographique, l'analyte se divise entre les 2 phases et sera maintenu dans le système proportionnellement à son affinité pour la phase stationnaire :

$$K_a = C_s / C_m$$

Où K_a : Coefficient de partage

C_s : Concentration de l'analyte A dans la phase stationnaire

C_m : Concentration de l'analyte A dans la phase mobile.

C'est ce rapport qui contrôle le taux de migration d'un analyte. Un soluté avec K_a élevé aura une grande affinité pour la phase stationnaire et se déplacera lentement à travers la couche.

III.1.3. Rétention / Rapport frontal

La position de n'importe quel spot se caractérise par sa rétention (ou rapport frontal (R_f)). Elle a une valeur fondamentale qualitative exprimée en :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par l'analyte}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

(Z_s) (Z_f)

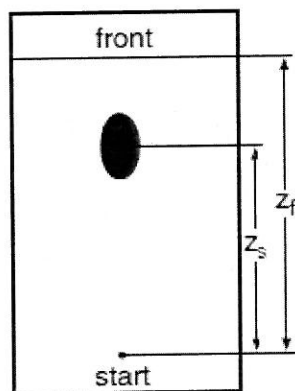


Figure 1. Les paramètres de la CCM utilisés dans le calcul du R_f [5]

La reproductibilité des valeurs du R_f dépend de nombreux facteurs, tels que la qualité de l'adsorbant, la qualité du dépôt, l'humidité, l'épaisseur de la couche, la distance de développement et la température ambiante.

III.1.4. Facteur de capacité

Le facteur de capacité d'une substance est défini comme le rapport de son temps de rétention dans la phase stationnaire (t_s) sur celui de la phase mobile (t_m) :

$$k = t_s/t_m$$

k est lié à R_f par l'équation :

$$R_f = 1/k + 1 \text{ ou } k = (1 - R_f)/R_f$$

k peut également être décrit par le rapport du nombre total des moles d'analytes dans chaque phase. Elle est principalement contrôlée par la force de la phase mobile, la nature de la phase stationnaire et la température à laquelle la séparation est effectuée.

Si une substance ne migre pas (c'est-à-dire qu'aucune trace de la substance ne

peut être détectée dans la phase mobile) alors la valeur du $R_f = 0$.

Une substance qui migre de la moitié de la longueur de séparation ($R_f = 0,5$), son temps de rétention dans la phase mobile serait le même que son temps de rétention dans la phase stationnaire, et donc $k = t_s/t_m = 1$.

Une substance qui migre avec le front n'est pas retenue par la phase stationnaire. La valeur du R_f est 1 et $k = t_s/t_m = 0/1 = 0$.

Lorsque le facteur de capacité est < 1 , l'élution de l'analyte est si rapide que la détermination exacte de son temps de rétention est très difficile. Un facteur de capacité élevé (> 20) signifie que l'élution prend un temps très long. Idéalement, le facteur de capacité pour un analyte se situe entre 1 et 5.

III.1.5. Le nombre de séparation

Le nombre de séparation est défini comme le nombre maximum de substances qui sont totalement séparées entre $R_f = 0$ et $R_f = 1$, et ce, uniquement si les conditions de séparation sont isocratiques. Le nombre de séparation (SN) est donné par l'expression :

$$SN = (Z_f / b_0 + b_1) - 1$$

Où Z_f : distance du front de migration.

b_0 : largeur du spot avec $R_f = 0$

b_1 : largeur du spot avec $R_f = 1$

L'exactitude de la détermination de la valeur du R_f dépend du SN :

$$\Delta R_f = 1 / SN + 1$$

Où ΔR_f : différence entre deux R_f adjacents, mais des spots complètement séparés.

III.1.6. Hauteur de la plaque

La mesure la plus commune de l'efficacité d'un système chromatographique est le nombre de plateaux à l'origine appelé « le nombre de plateaux théoriques contenu dans le système chromatographique sur colonne ». La basse efficacité de séparation de la CCM en comparaison avec la chromatographie liquide a abouti à ce que le concept de plateaux théoriques soit moins fréquemment appliqué en CCM. Mais une tentative bien réussie d'augmenter, ces dernières années, l'efficacité de la technique a bien conduit à l'application du concept de plateau théorique à la CCM. L'élargissement du spot peut être simplement exprimé en termes de nombre de plateaux théoriques N d'un système chromatographique donné:

$$N = 16 Z_f Z_s / W_s$$

Où Z_f et Z_s sont les distances de migration de la phase mobile et du soluté respectivement ; W_s est la largeur du spot dans la direction de migration de la phase mobile.

N peut être également calculé par l'équation:

$$N = 16 (Z_s / W_s)^2$$

Le calcul du nombre de plateaux basé sur cette équation est démontré dans la figure suivante (fig.2):

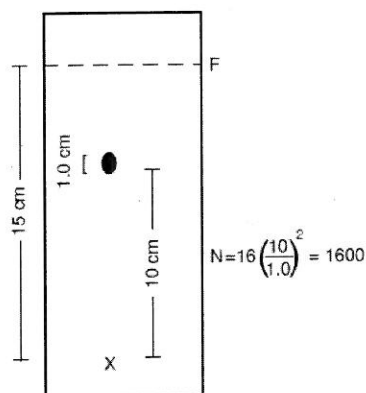


Figure 2. Calcul du nombre de plateaux (X = origine, F = front de solvant) [6]

Bien que les valeurs numériques de N obtenues pour différents solutés sur la même plaque chromatographique coïncident assez bien, elles diffèrent habituellement de manière significative pour un autre type de plaque. Pour cette raison, la quantité de N peut être considérée comme une mesure approximative de l'efficacité de séparation des plaques chromatographiques. Elle est proportionnelle à la distance de migration de la phase mobile Z_f , de telle façon que lorsque le rapport Z_s/W_s demeure constant, une augmentation de Z_f a comme conséquence une augmentation de N et donc une meilleure séparation. Cette proportionnalité entre N et Z_f est donnée par la relation :

$$N = Z_f/H$$

Où H est la valeur dite HETP (c'est à dire, la hauteur équivalente d'un plateau théorique).

H (ou simplement la hauteur de la plaque) mesure l'efficacité d'un système chromatographique donné par unité de longueur de la distance de migration de la

phase mobile (Zf).

Les petites valeurs de H signifient des systèmes chromatographiques plus efficaces et de plus grandes valeurs de N. Le but principal pour améliorer la performance des couches minces est l'obtention de petites valeurs de H et des valeurs maximales N. Comme dans les autres techniques chromatographiques, l'efficacité d'un système donné de CCM est meilleure (c.-à-d. H est plus petite) pour les petites particules de la phase stationnaire, les phases mobiles moins-visqueuses à faible débit ; et les petites molécules des solutés.

III.1.7. La résolution

L'objectif principal de la chromatographie est la séparation des constituants dans un mélange. Cependant, les spots de deux solutés adjacents peuvent se chevaucher à un degré plus ou moins important dans de nombreux cas. La séparation entre les deux spots est mesurée par la valeur de R_s , qu'on appelle 'résolution' [7]. Le R_s de deux spots adjacents 1 et 2 est défini comme étant égal à la distance entre les deux centres des spots divisé par leurs largeurs moyennes (fig. 3):

$$R_s = \frac{z_2 - z_1}{0,5 (w_1 + w_2)}$$

La valeur de R_s sert à définir la séparation. Lorsque $R_s=1$, les deux spots sont bien séparés. Des valeurs de $R_s > 1$ indiquent une meilleure séparation tandis que les valeurs de $R_s < 1$ indiquent une mauvaise séparation.

L'enchevauchement des spots devient plus gênant lorsqu'un spot est plus concentré en soluté que le spot adjacent.

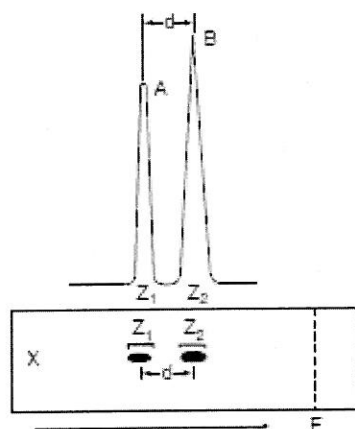


Figure 3. Résolution chromatographique [6]

R_s est également donnée par l'équation :

$$R_s = R_{f(2)} - R_{f(1)} / 0,5 (w_1 + w_2)$$

Où $R_{f(1)}$ et $R_{f(2)}$ sont respectivement les valeurs du R_f des spots 1 et 2.

Supposant les profils gaussiens de concentration de deux spots étroitement espacées et la valeur moyenne du R_f pour chacun d'eux ($R_{f(1)} \approx R_{f(2)} = R_f$), l'équation ci-dessus peut être écrite comme :

$$R_s = \begin{matrix} \text{(I)} & \text{(II)} & \text{(III)} \\ 0,25 (K_2/K_1 - 1) (R_f \cdot N)^{1/2} (1 - R_f) \end{matrix}$$

Où K_1 et K_2 sont les coefficients de distribution des solutés 1 et 2 entre la phase stationnaire et la phase mobile.

Cette équation est la version CCM d'une relation chromatographique fondamentale qui étudie l'influence de K_2/K_1 , N , et R_f sur la résolution des spots: K_2/K_1 surveille l'interdépendance entre la phase stationnaire et la phase

mobile, R_f surveille la force d'élution de la phase mobile et N dépend de la longueur de migration de la phase mobile et de la hauteur des plaques c.-à-d Z_f et H respectivement.

III.1.8. Sélectivité

La sélectivité de la séparation est rarement mentionnée dans le cas de la CCM bien qu'aucune raison sérieuse ne puisse être donnée pour éviter ce terme. Au contraire, la sélectivité de la séparation est une notion chromatographique utile, peu importe la technique envisagée.

Dans le cas de la CCM, le facteur de sélectivité α peut être défini comme ($\alpha = K_2/K_1$) qui reste en pleine conformité avec la définition utilisée pour la technique sur colonne. En fait, le facteur de séparation α utilise une partie de l'équation précédente décrivant la résolution R_s de deux spots enchevauchés. On peut affirmer qu'avec une plus grande différence entre les coefficients de distribution des solutés 1 et 2 (K_1 et K_2), on observe une plus grande sélectivité de la séparation α et une meilleure résolution (R_s).

Avec $K_1 = K_2$, les deux spots entièrement enchevauchés ($\alpha=1$) et la résolution R_s est nulle. Plusieurs options pour augmenter α sont disponibles et peuvent être classées par ordre d'impact décroissant : changement dans la composition de phase mobile, changement du pH de la phase mobile, changement de phase stationnaire, changement de température et les effets chimiques spéciaux.

IV. AUTOMATISATION ET ASPECTS EXPERIMENTAUX DE L'HPTLC

Ce chapitre fournit des informations détaillées sur le développement analytique basé sur l'HPTLC [8-14]

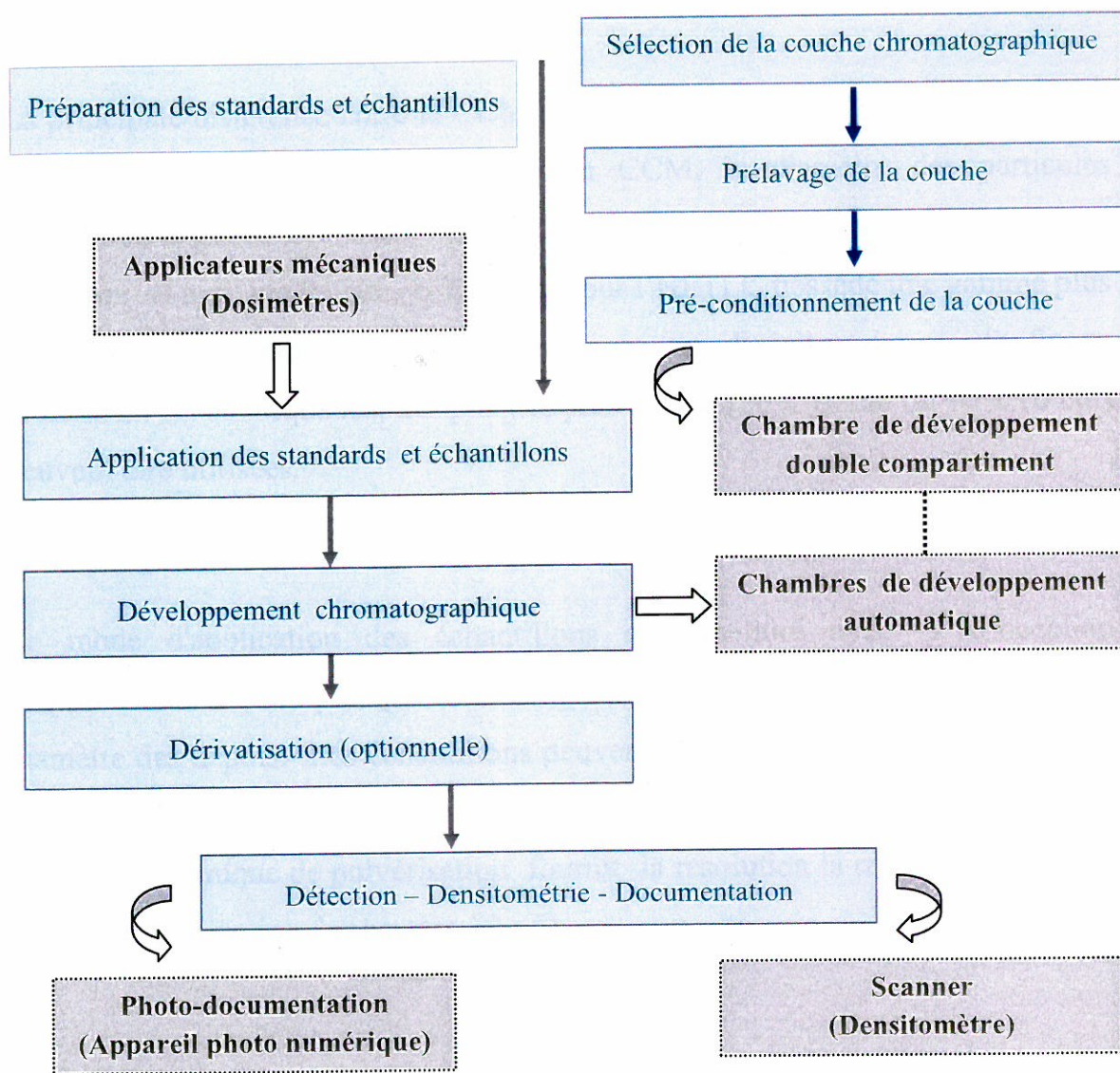


Figure 4. Les étapes impliquées dans l'HPTLC [15,16]

NB : Les considérations citées ci-dessous concernent le gel de silice comme phase stationnaire et le développement est décrit comme processus linéaire isocratique en mode vertical.

IV.1. La qualité de la couche adsorbante

La principale différence entre la CCM classique et la CCM à haute performance réside dans la taille des particules : en CCM, le diamètre des particules constituant le gel de silice selon *Stahl* [17] est de 10 à 60 μm avec une moyenne d'environ 20 μm , tandis que celui utilisé pour l'HPTLC possède une gamme plus étroite et une granulométrie plus fine avec un diamètre moyen de 5 μm seulement. En conséquence, des plaques plus petites (20 x 10 cm ou 10 x 10 cm) peuvent être utilisées.

IV.2. La qualité du dépôt

Le mode d'application des échantillons est amélioré avec la conception d'applicateurs mécaniques (dosimètres) permettant la réduction du volume et du diamètre des dépôts. Les échantillons peuvent être appliqués soit sous forme de spots par contact ou de bandes étroites par pulvérisation avec un flux de gaz inerte. La technique de pulvérisation fournit la résolution la plus élevée car elle empêche la diffusion des bandes (fig.5).

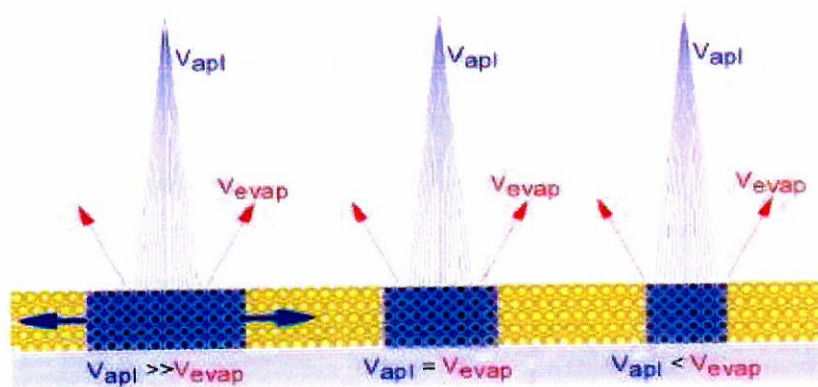


Figure 5. Influence de la vitesse d'application par pulvérisation : la vitesse de dépôt est inférieure à la vitesse d'évaporation du solvant de dissolution ce qui empêche la diffusion des bandes [18]

IV.3. Le développement chromatographique (séparation)

Une spécificité de la chromatographie sur couche mince est la présence d'une phase gazeuse en plus des phases stationnaire et mobile. Lorsque le liquide monte par ascension capillaire, la surface de la plaque est mouillée et un flux d'évaporation se produit perpendiculairement à la direction de la migration du solvant. Inversement, la présence de solvant dans la cuve de développement entraîne la présence inévitable de vapeurs qui peuvent s'adsorber sur la couche poreuse sèche en remplissant l'espace intergranulaire ; le résultat est une imprégnation préalable de la couche, une accélération de la vitesse de montée du front du solvant. Les deux effets antagonistes (évaporation et adsorption) sont souvent concomitants et la situation classique est celle où le solvant se vaporise derrière le front et s'adsorbe sur la couche encore sèche (figure 6).

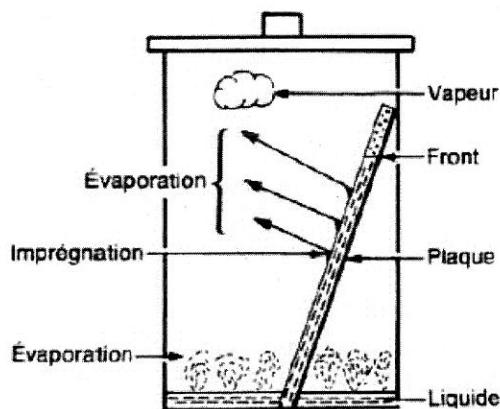


Figure 6. Processus de développement dans une cuve normale : influence de la phase vapeur [19]

De ce fait, les séparations réalisées en CCM /HPTLC seront fortement affectées par cette phase vapeur qui dépend du type la taille et l'état de saturation de la chambre pendant le développement. Les interactions de ces trois phases, ainsi que d'autres facteurs, comme la température et l'humidité relative, doivent être contrôlées pour obtenir des séparations reproductibles.

Plusieurs types de chambres de développement sont disponibles pour l'HPTLC, Cependant, la chambre la plus couramment utilisée est la chambre à double compartiment [20-56], qui est considérée comme la forme la plus polyvalente de la chambre normale [57].

La chambre à double compartiment (Fig.7) est séparée en 2 parties, le solvant de conditionnement est placé dans un compartiment ce qui permet à sa phase vapeur de saturer la chambre (étape de saturation) et en même temps d'interagir avec la phase stationnaire qui est placée dans l'autre compartiment dans la chambre (étape de pré-conditionnement). Ensuite, le solvant de développement est

introduit dans le compartiment où la plaque a été mise en place et le développement peut commencer.

Selon *Kalasz et Bathori* [58], les chambres à double compartiment minimisent la consommation de la phase mobile, réduisent le temps nécessaire pour les séparations et assurent un pré-équilibre reproductible entre la phase stationnaire, le système de solvant utilisé et la phase vapeur.

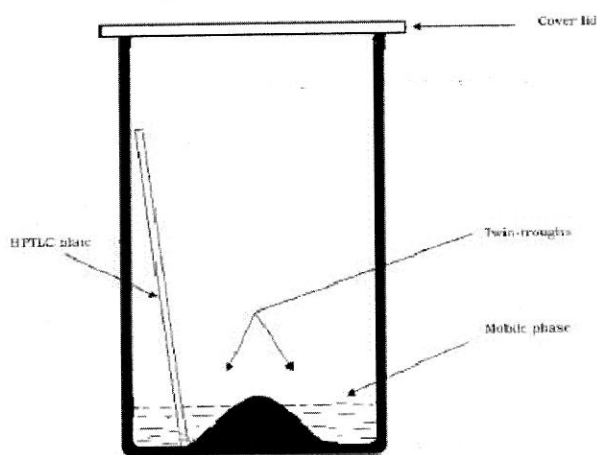


Figure 7. Processus de développement dans une chambre à deux compartiments [59]

En HPTLC, ces chambres sont sous forme de système entièrement automatisée qui permet le suivi et le contrôle de la totalité des paramètres de la migration, depuis l'insertion jusqu'au séchage final de la plaque uniformément après développement.

IV.4. L'évaluation du chromatogramme

IV.4.1. L'évaluation qualitative

- La densitométrie classique

Le densitomètre utilise une lumière monochromatique et une fente de longueur et largeur sélectionnable pour balayer les pistes du chromatogramme. Les spectres d'absorption enregistrés servent à l'identification des différentes substances et à la sélection des longueurs d'ondes de mesure les plus appropriées.

- L'acquisition électronique d'image

L'acquisition électronique d'image utilise une lumière polychromatique (lumière blanche, UV 254 ou UV 366) pour éclairer l'objet entièrement et pour capturer une image électronique avec un appareil photo numérique. Cette possibilité d'obtenir une «impression visuelle» du chromatogramme est l'un des principaux avantages de l' HPTLC par rapport aux autres techniques chromatographiques.

IV.4.2. L'évaluation quantitative

Les densitomètres explorent chaque spot par réflexion, en mode absorbance ou fluorescence, d'un faisceau lumineux.

En densitométrie par « réflexion- absorption », le chromatogramme est balayé par le faisceau lumineux et l'appareil mesure l'intensité de la lumière réfléchie. Les différences d'intensité lumineuse entre l'adsorbant et les spots se traduisent à l'enregistrement par une série de pics dont l'aire correspond à la quantité de substance séparée. La relation entre le signal mesuré et la quantité de soluté au niveau de chaque spot est obtenu en ajustant une fonction de régression appropriée à l'ensemble de données d'étalonnage (une courbe de régression

quadratique est généralement utilisée pour représenter les données d'étalonnage [59]). La courbe d'étalonnage est ensuite utilisée pour une analyse ultérieure.

Les mesures par « réflexion– fluorescence » représentent un certain nombre d'avantages par rapport à la « réflexion– absorption », à savoir, la relation entre la lumière émise et la quantité de soluté est linéaire, ce qui permet d'obtenir un intervalle de mesure plus large. D'autre part, le niveau de bruit est beaucoup plus bas et, par conséquent, des mesures quantitatives plus sensibles peuvent être réalisées.

L'HPTLC est donc une adaptation moderne de la CCM avec une meilleure efficacité de séparation. Le tableau ci-dessous compare entre CCM et l'HPTLC:

Tableau I - Comparaison entre CCM et HPTLC. [11]

Paramètres	HPTLC	CCM
Technique	Automatisée / Instrumentale	Manuelle
plaque	Plaque à haute performance	Plaque standard
Taille des particules	5-6 μm	10 – 12 μm
Epaisseur de la couche	100 μm	250 μm
Dimensions de la plaque	20 x 10 cm ou 10 x 10 cm	20 x 20 cm
Efficacité	Elevée en raison de la petite taille des particules	Plus basse
Distance de séparation	5-7 cm	10–15 cm
Temps séparation	3–20 min	20–200 min
Cuve de développement	Configuration spéciale Faible consommation de la phase mobile (10-15 ml).	Chambre normale
Méthode de dépôt	Déposeur automatique	Manuelle/semi-automatique
Type de dépôt	Spot ou Bandes	Spot
Volume d'échantillon	Spot : 0.1 à 0.5 μl Bande : 0.5 à > 50 μl	Spot : 1 à 5 μl
Diamètre des dépôts au début	1–1.5 mm	3–6 mm
Diamètre des dépôts séparés	2–5 mm	6–15 mm
Identification	Rf, densitométrie, acquisition d'images numériques.	Rf, visualisation des spots à l'œil nu.
Documentation	Possible	Impossible
Reproductibilité	Reproductible	Difficile
Temps d'analyse	Court	Plus long

CHAPITRE II

La validation d'une procédure analytique

I. INTRODUCTION

Le concept de la validation des méthodes analytiques est bien connu et accepté dans toutes les industries pharmaceutiques, chimiques, biopharmaceutiques ou agroalimentaires qui développent des procédures analytiques ou qui utilisent des méthodes analytiques pour le contrôle qualité de leurs produits. En effet, la validation est une étape obligatoire du cycle de vie d'une méthode analytique comme elle a été hautement réglée par différents référentiels tels que :

- les documents ISO 5725 [87]
- les documents ISO 17025 [88]
- les documents ICH Q2 (R1) [89]
- les documents FDA [90]
- les décisions 2002/657/EC pour l'industrie chimique et agroalimentaire [91]
- les articles relatifs à la conférence de Washington [92]
- les guides FDA pour les études bio-analytiques [93]

Les critères de validation et leurs méthodologies ont été largement définis et discutés dans la littérature scientifique [94 ,95]. Le premier article qui a été publié dans la revue "les technologies de laboratoire" [99] avait pour objectif d'aider les industriels du médicament à valider une méthode analytique et mieux appliquer les recommandations réglementaires : les guidelines ICH Q2A et Q2B (fusionnés en Q2(R1) en Novembre 2005) et celles de la commission SFSTP 92 [100]. Si ces premiers guides ont largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des faiblesses quant aux conclusions des tests statistiques réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une

procédure analytique.

Récemment une nouvelle commission SFSTP a publié un guide en 2003 [12] qui propose de revoir les bases même de la validation analytiques pour une démarche harmonisée, en distinguant notamment les règles de décision. Cette approche est basée sur l'erreur totale (biais + écart type) avec l'introduction du profil d'exactitude comme outil de décision. Cette approche a l'avantage qu'elle s'applique à toutes les techniques analytiques quelque soit le type d'industrie qui l'utilise et indépendamment de la matrice dans laquelle le soluté est analysé (formulation pharmaceutique, fluide biologique, sol, etc.)

II. DEFINITION DE LA VALIDATION

La validation, dans son terme général, est l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de Bonnes Pratiques de Fabrication, que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés. [74]

F.D.A : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définies à l'avance ». [75]

III. BUT DE LA VALIDATION

L'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée.

IV. Rappel sur les éléments de validation selon l'approche classique (ICH 94, SFSTP 92)

Toute méthode d'analyse est classiquement caractérisée (et validée) à l'aide d'une série de critères qui doivent être appliqués en fonction de la rubrique à valider. (Tableau II)

Tableau II - Critères de validation en fonction de l'objectif de la méthode d'analyse.

Niveau	Critère
<i>Identification</i>	Spécificité
<i>Essai (teneur en impureté)</i>	Spécificité Seuil de détection ou seuil de quantification
<i>Dosage (teneur ou activité)</i>	Spécificité Linéarité Justesse Fidélité : - répétabilité - reproductibilité Seuil de quantification (Robustesse)

IV.1. Intervalle de dosage (ICH, SFSTP)

L'intervalle de validité d'une procédure d'analyse est le domaine entre les niveaux supérieurs et inférieurs (inclus) de substance à doser pour lequel, il a été démontré que la procédure est appropriée quant à : sa fidélité, son exactitude et sa linéarité.

IV.2. La spécificité (ICH, SFSTP)

Selon l'ICH : la spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'identification et le dosage univoque de la substance à analyser, en présence des composés susceptibles de l'accompagner. Ces composés contiennent typiquement les impuretés, les produits de dégradation, la matrice, etc.

Selon la STSTP : une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substances dans l'échantillon.

Il convient d'évaluer la spécificité des tests d'identité, de dosage des impuretés et de la teneur. Le choix des moyens utilisés pour démontrer la spécificité dépend de l'objectif de la méthode d'analyse.

Pour démontrer la spécificité des méthodes chromatographiques, il convient de présenter des chromatogrammes représentatifs où chacune des composantes est adéquatement identifiée. L'évaluation des séparations chromatographiques déterminantes doit être aussi poussée qu'il est nécessaire. On peut démontrer la spécificité de ces méthodes en les utilisant pour séparer deux des composantes dont les pics d'élution sont les plus proches l'un de l'autre. [76]

IV.3. La linéarité (ICH, SFSTP)

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon.

En règle générale, la linéarité d'une procédure est établie en appliquant la méthode testée à des séries d'échantillons préparées à partir d'une solution mère. Il est recommandé donc d'utiliser au minimum 5 niveaux différents de concentration et d'effectuer au minimum 3 séries indépendantes de ces 5 concentrations (sur le PA seul et la forme pharmaceutique reconstituée), à raison d'une série par jour.

Pour évaluer la linéarité, il convient d'établir un graphique des réponses obtenues en fonction de la concentration, et de procéder à un examen visuel de ce graphique. Si la relation est linéaire, il faut alors analyser les résultats par des méthodes statistiques appropriées. Le coefficient de corrélation, l'ordonnée à l'origine, la pente de la droite de régression sont autant d'expressions mathématiques permettant d'évaluer la linéarité des relations obtenues expérimentalement.

IV.4. Exactitude / Justesse (ICH, SFSTP)

L'ICH considère que l'exactitude d'une procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne trouvée en faisant un certain nombre de mesure et une valeur acceptée comme étant conventionnellement vraie ou une valeur de référence.

Selon la SFSTP : Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est

acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie (standard interne de la firme) soit comme une valeur de référence acceptée (standard international, par exemple standard de la pharmacopée) et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois.

Il convient d'évaluer l'exactitude sur tout l'intervalle de mesure spécifié pour la procédure analytique considérée.

IV.5. Fidélité (ICH, SFSTP)

La fidélité d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle peut être évaluée à trois niveaux, à savoir la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité.

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard: manipulateur, matériel, réactifs préparés etc.

IV.5.1. Répétabilité : est la fidélité obtenue dans les conditions opératoires identiques (même laboratoire, même opérateur, même équipement...) et dans un court intervalle de temps.

Elle doit être évaluée soit :

- sur la base d'au moins 9 déterminations couvrant l'intervalle de mesure spécifié (exemple : 3 concentrations avec 3 répétitions pour chaque concentration).
- sur la base d'au moins 6 déterminations à 100 % de la concentration d'essai avec 3 répétitions par jour.

IV.5.2. Fidélité intermédiaire : est l'expression de la variabilité intra-laboratoire (mesures effectuées à des jours différents, par des analystes différents, avec un équipement différent...).

L'ampleur des études à effectuer pour évaluer la fidélité intermédiaire dépend des circonstances dans lesquelles il est prévu d'appliquer la procédure analytique. Le demandeur doit établir l'effet de différents événements aléatoires sur la fidélité de la procédure. Les facteurs de variation types à étudier comprennent les variations d'un jour à un autre, d'un analyste à un autre, d'un équipement à un autre, etc.

Son protocole d'étude est le même que celui appliqué pour la répétabilité en effectuant deux autres séries d'essais qui intègrent les variations.

La reproductibilité n'est envisagée que dans le cas d'étude inter-laboratoires.

IV.6. Limite de détection (ICH, SFSTP)

Selon ICH : la limite de détection (LD) d'une procédure analytique donnée est la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être détectée dans un échantillon, sans forcément pouvoir être quantifiée de façon exacte.

Selon la STSTP : c'est la plus petite quantité de la substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte. Le seuil de détection est généralement un paramètre des essais limites.

La limite de détection peut être exprimée par la relation suivante :

$$LD = 3.3 \sigma/S$$

Où σ = écart type de la réponse ;

S = pente de la courbe d'étalonnage.

IV.7. Limite de quantification (ICH, SFSTP)

Selon l'ICH : la limite de quantification (LQ) d'une procédure analytique donnée est la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être quantifiée, dans un échantillon avec une exactitude et une fidélité appropriées. La limite de quantification est un paramètre intervenant dans les analyses quantitatives pour les composés présents à faible concentration dans des matrices. Elle est notamment utilisée pour le dosage des impuretés et /ou des produits de dégradation et lors de l'établissement de la cinétique de dissolution d'une spécialité pharmaceutique.

Selon la SFSTP : c'est la plus petite quantité de la substance à examiner pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies.

Les méthodes utilisées pour la détermination de la limite de quantification et la limite de détection sont similaires, la seule différence étant le multiplicateur de l'écart type de la réponse :

$$LQ = 10 \sigma/S$$

V. LIMITES DE L'APPROCHE CLASSIQUE DE LA VALIDATION

Les méthodes de validation classiquement utilisées correspondent plutôt à la caractérisation du processus d'analyse. La sélectivité, la linéarité, la fidélité et les limites de quantification et détection sont les principaux paramètres nécessaires à la connaissance de la performance d'une méthode [77]. En effet, le calcul de toutes ces grandeurs spécifiques de la méthode étudiée ne permet en aucun cas de répondre à la question de l'adaptation de la méthode à son objectif analytique. De plus, ces méthodes de validation reposent sur un raisonnement erroné. Le protocole d'analyse est considéré comme valide quand la valeur vraie est comprise dans la dispersion des résultats obtenus (cette dispersion suit la loi normale, définie par une moyenne m et un écart-type σ).

Donc, moins la méthode d'analyse est précise, c'est-à-dire plus la dispersion des résultats est élevée, plus il y a de chance que la valeur vraie et la valeur moyenne des résultats apparaissent comme non significativement différentes, c'est à dire que les résultats soient considérés comme exacts (fig.8).

Pour éviter de telles anomalies, une réflexion a été portée sur la validation des méthodes dans différents domaines, notamment dans l'industrie pharmaceutique. La Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) a développé une nouvelle procédure de validation basée sur un outil statistique, les profils d'exactitude [67-71]. En complément d'une étude de sélectivité de la méthode d'analyse, cette procédure permet de minimiser le risque d'accepter une procédure incorrecte, ou de refuser une procédure répondant correctement à son objectif.

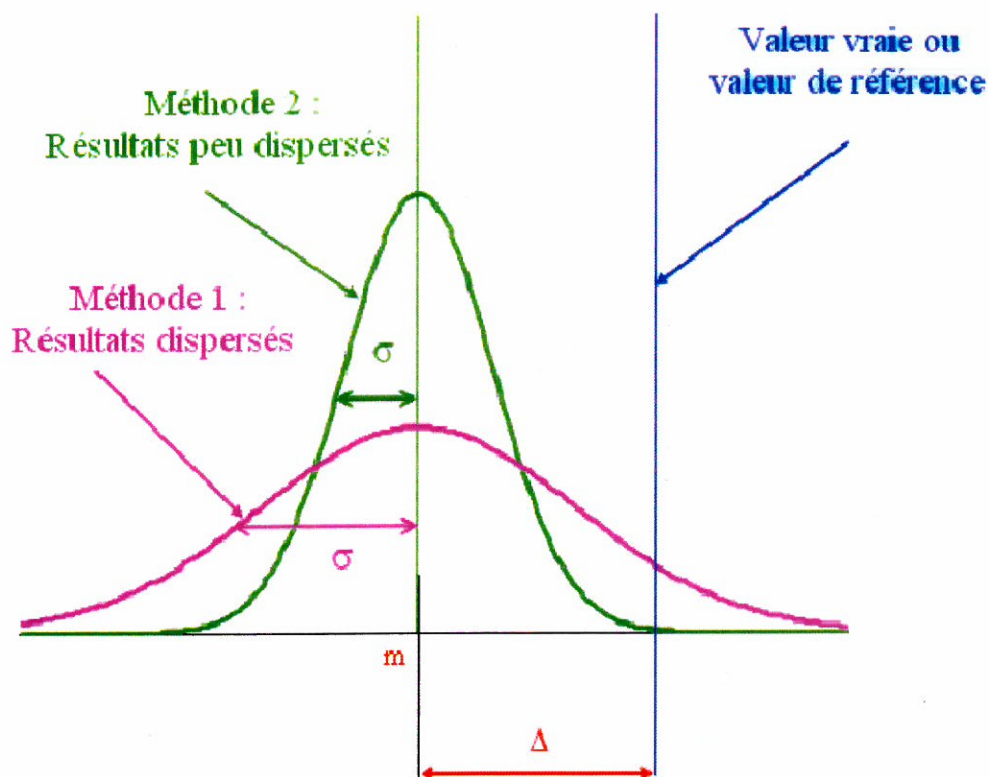


Figure 8. Illustration d'une anomalie possible avec les méthodes classiques de validation. La valeur vraie est comprise dans la distribution des résultats de la méthode 1 mais pas dans celle de la méthode 2. Bien que les deux méthodes aboutissent à la même erreur moyenne Δ , la méthode 1 moins précise est considérée comme juste.

VI. L'apport de la nouvelle approche SFSTP 2003 (profil d'exactitude)

Récemment, une nouvelle stratégie de validation basée sur le profil d'exactitude a été introduite. Elle est en parfait accord avec l'objectif d'une méthode analytique, à savoir sa capacité de quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues qu'un laboratoire aura à déterminer.

La nouvelle stratégie de validation [78] permet d'associer les deux éléments fondamentaux de la validation que sont la justesse et la fidélité au résultat final d'une mesure, et par conséquent de tenir compte de l'erreur totale de mesure (erreur systématique + erreur aléatoire).

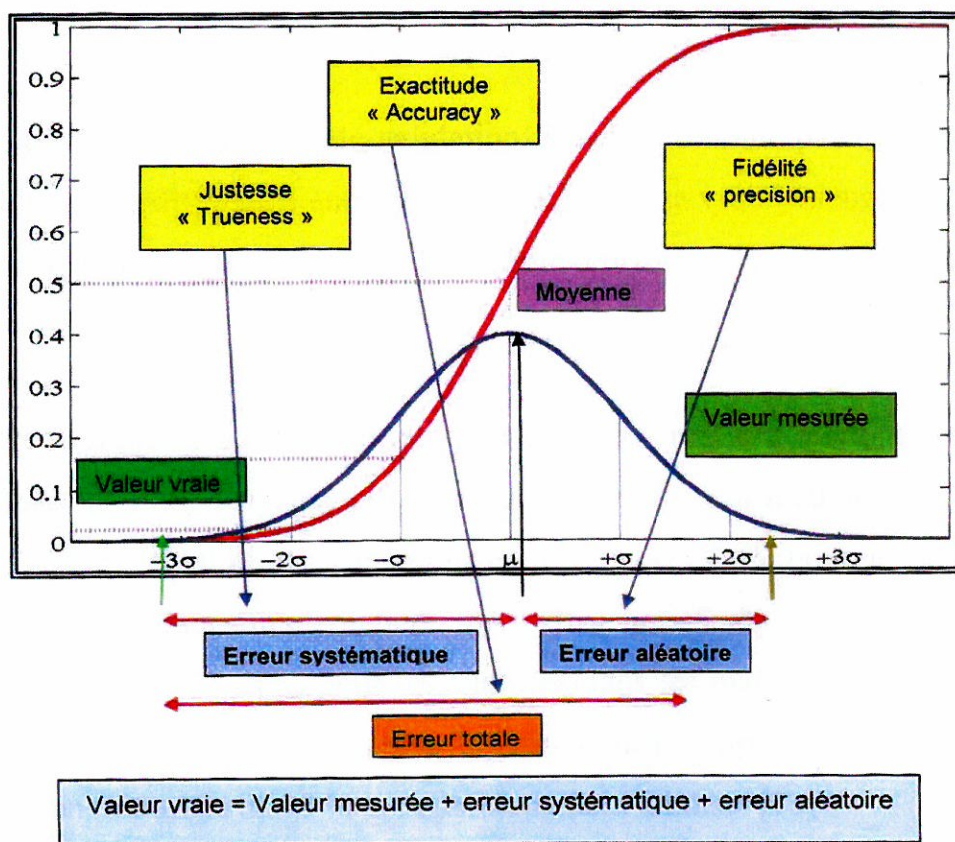


Figure 9. Représentation graphique de l'exactitude, de la justesse et de la fidélité des résultats d'une méthode d'analyse. Ces résultats suivent la loi normale, définie par la moyenne m et l'écart-type σ .

D'après la figure 9, la différence entre une valeur expérimentale Y_i et la valeur vraie définit l'erreur totale de la méthode d'analyse. Cette erreur est une combinaison de l'erreur systématique (définie par le biais) et de l'erreur aléatoire (définie par la variance des différents résultats obtenus pour un même échantillon).

▪ Principe de la validation par le profil d'exactitude

Le principe de cette stratégie de validation peut être traduite par l'équation (I), qui stipule que la différence entre une mesure (x) et sa vraie valeur (μ) doit être inférieure à la limite d'acceptation $|\lambda|$ définie *a priori*.

$$-\lambda < x - \mu < \lambda \iff |x - \mu| < \lambda \quad (I)$$

La notion de limite d'acceptation introduit donc un premier critère permettant à l'analyste de prendre des décisions basé sur l'objectif de la méthode analytique. Communément, la limite d'acceptation est de 1% ou 2 % pour le dosage de principes actifs dans une matière première, de 5 % pour les formes pharmaceutiques et de 15 % pour les analyses dans les matrices biologiques ou environnementales. Pour la détermination des impuretés, une limite d'acceptation minimale de 10 % est communément admise. [73]

Le profil d'exactitude est construit à partir des estimés de l'intervalle de tolérance d'espérance β de mesures attendues à chaque niveau de concentration. Une autre notion importante définie est celle de « bonne procédure analytique » avec un risque connu qui peut se traduire par la relation suivante (II) :

$$\Pr [x - \mu > \lambda] \leq \beta \quad (II)$$

Avec β la proportion de mesures dans les limites d'acceptation, et λ la grandeur définissant les limites d'acceptation fixées a priori en fonction des contraintes du secteur d'activité. Le risque associé d'une procédure s'évalue par la proportion attendue de mesures en dehors des limites d'acceptation. Le risque associé dépend des estimés du biais et de la précision de la procédure analytique obtenus en phase de validation comme le montre la figure suivante (fig.10)

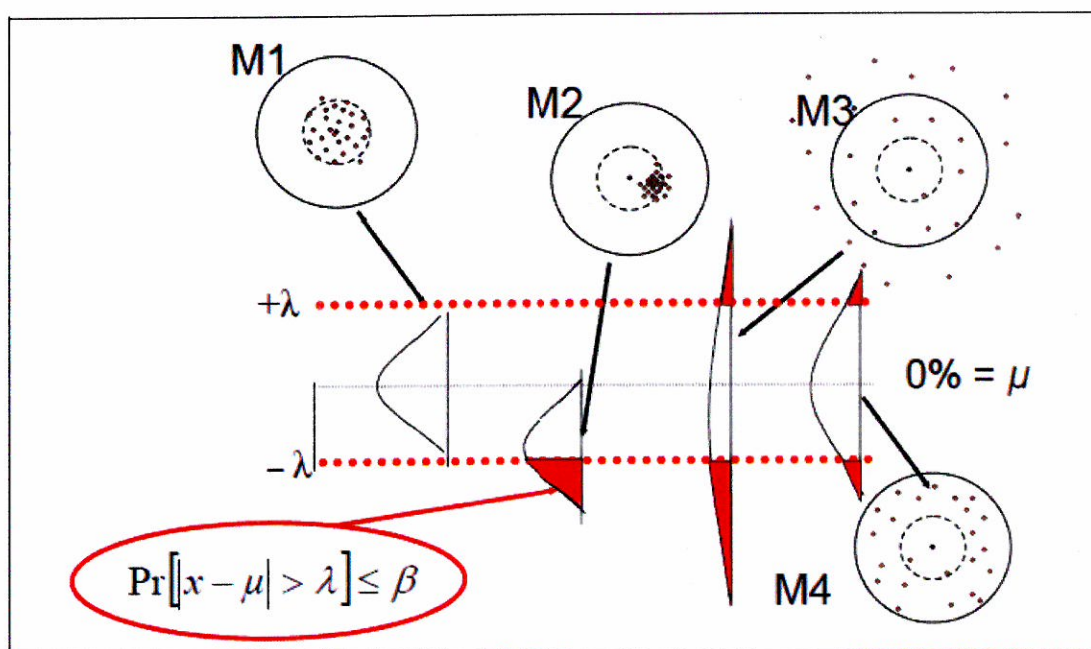


Figure 10. Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes M1 (fidèle et juste), M2 (fidèle mais non juste), M3 (non fidèle et non juste) et M4 (non fidèle mais juste)

Ainsi, le profil d'exactitude est un outil de décision basée sur le risque associé à la méthode. La notion de risque est liée à la garantie concernant la future analyse des échantillons inconnus tout en appliquant la méthode validée.

Par conséquent, le profil d'exactitude peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique suivant l'usage attendu. Par ailleurs, le profil peut également être utilisé comme outil de diagnostique. Par exemple, il peut être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration et pour déterminer les limites de quantification supérieure et inférieure et à sélectionner ainsi que l'intervalle de dosage.

B. PARTIE EXPERIMENTALE

I. INTRODUCTION

Objectif

L'objectif de cette deuxième partie est le développement d'une méthode simple pour le dosage de l'azithromycine par HPTLC ainsi que de démontrer au moyen de la validation basée sur le profil d'exactitude que la méthode utilisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant des résultats fiables.

L'azithromycine

Décrite en 1952 par McGuire et al. sous le nom d'ilotycine [79], l'érythromycine est restée longtemps le principal macrolide d'usage clinique courant, tant en Europe qu'en Amérique du Nord. Cependant, à partir des années 1985-1990, nous avons assisté à l'introduction successive et rapide de nouvelles molécules dérivées de l'érythromycine et regroupées sous le nom de «néomacrolides» telle que l'azithromycine dont cette étude fait l'objet.

L'azithromycine (N-méthyl-9a-aza-9-deoxo-9-dihydro-9a-homoerytromycin A) a été synthétisée et décrite simultanément par les laboratoires de Pfizer Inc. aux E.U. [81] et les laboratoires de Sour Pliva Farmaceutska en Yougoslavie (actuelle Croatie) [82]. Elle a été obtenue par un agrandissement du cycle apporté au niveau du C9 par insertion d'un atome d'azote (N9a) et suppression simultanée de la fonction cétone en C9 par réduction du carbone 5 (fig.11). Elle est donc intrinsèquement stable. Cette structure nouvelle, comprenant un azote endocyclique ionisable (fonction aza), l'a fait rangé dans la sous-classe particulière des azalides, sans que ceci n'ait un impact clinique en tant que tel.

La propriété la plus exceptionnelle de l'azithromycine est son accumulation cellulaire très élevée [83, 84] entraînant des taux tissulaires 100 fois supérieurs à

la concentration sérique. Cette accumulation est associée à une forte rétention tissulaire ($t_{1/2}$ de 50 à 90 h) [85-87]. Ces deux propriétés justifient, d'une part, sa posologie générale très particulière (cures courtes de 3 à 5 jours avec administration uniquotidienne, voire même administration unique dans certaines situations) et, d'autre part, l'intérêt évident qu'elle peut avoir pour le traitement des infections intracellulaires [88, 89].

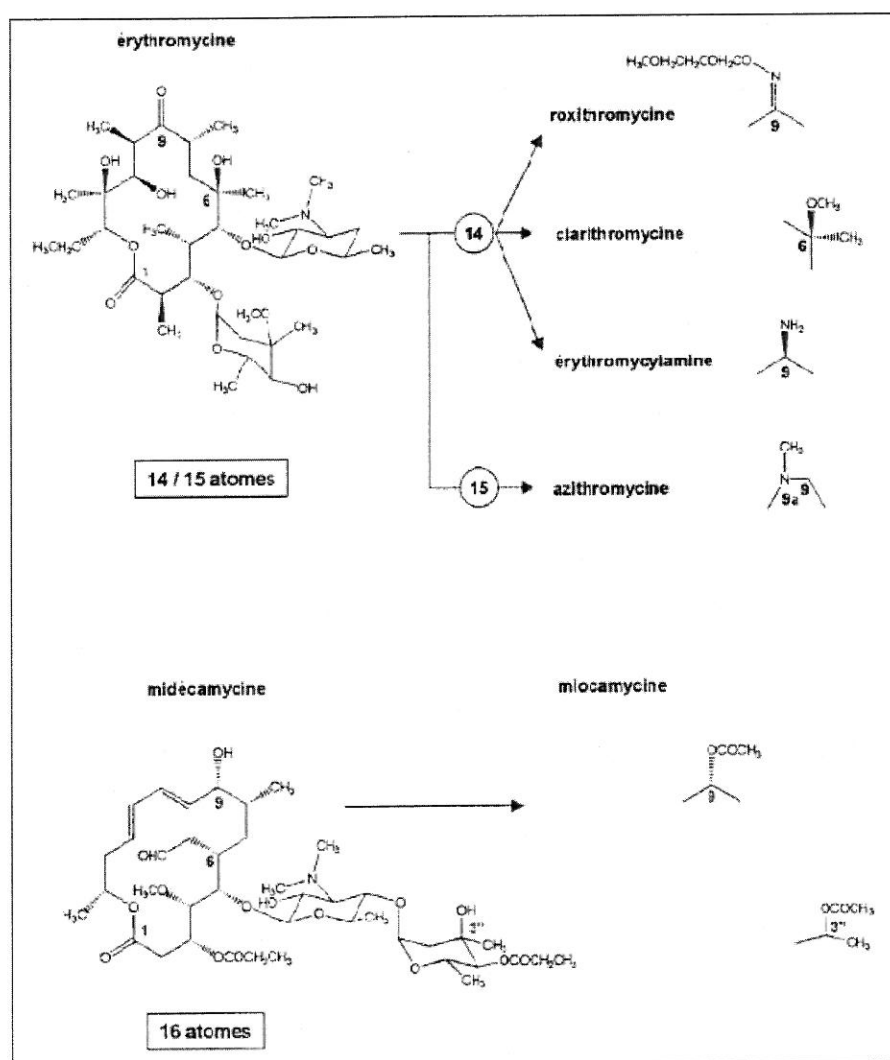


Figure 11. Structure chimique générale des macrolides. [107]

Chemical structure of a complex glycoside, identified as a saponin. The structure shows a steroid-like aglycone core with multiple hydroxyl groups and a methyl ester. Attached to the aglycone is a complex sugar moiety consisting of a pyranose ring linked to a pyrimidine ring, which is further linked to a side chain containing a quaternary ammonium group and a methyl ester. The structure is labeled with "x H₂O" indicating its hydrate form.

Selon la littérature disponible, la chromatographie liquide sur colonne est la plus recommandée pour le dosage de l'azithromycine dans les préparations pharmaceutiques. Les données relatives au comportement chromatographique de l'azithromycine ainsi que les différentes méthodes de détection employées, telles que les techniques UV [90-94] ou électrochimiques [95] ont été également incluses.

La pharmacopée américaine (USP) propose une méthode chromatographique sur colonne avec détection ampérométrique tandis que la pharmacopée européenne (PhEur) propose une autre méthode HPLC avec détection spectrophotométrique, mais ces deux méthodes nécessitent de colonnes spécifiques qui sont chères et difficiles à se procurer sur le marché. [96,97]

D'autres approches analytiques ont été développées récemment pour l'analyse quantitative de l'azithromycine sous formes pharmaceutiques, y compris la spectrofluorimétrie [98], la spectrophotométrie [99-111], la voltamétrie [112] ou l'ampérométrie [113].

Toutefois, la plupart de ces méthodes sont très sophistiquées et exigent une instrumentation coûteuse. Ce qui nous a conduit à penser à la chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) vu sa simplicité, sa fiabilité et son faible coût ; et ceci a été démontré expérimentalement avec succès dans de nombreuses applications.

Les principales applications de la chromatographie sur couche mince à haute performance

Beaucoup d'articles ont été publiés dans la littérature scientifique et qui décrivent l'utilisation de l'HPTLC dans de nombreux domaines d'analyse. [58, 114,115].

Kaale et al. [139] ont rapporté l'existence d'un grand nombre de publications concernant des méthodes CCM/HPTLC qui ont été élaborées, validées et appliquées dans l'analyse pharmaceutique pour le dosage des principes actifs et pour les tests de stabilité (tableau II). La plupart de ces publications étaient

originaires d'Asie (surtout de l'Inde), certains pays d'Europe occidentale, et une vingtaine étaient originaires d'Afrique où les équipements sophistiqués et coûteux pour l'analyse ne sont pas facilement accessibles.

L'HPTLC constitue également un outil idéal pour l'analyse des substances d'origine végétale. Une méthode HPTLC simple et reproductible a été réalisée avec succès pour le dosage des diterpénoïdes cités ci-dessus dans l'écorce des racines de *Photinia integrifolia*. Il s'agit des diterpénoïdes 1β , 3α , 8β -trihydroxy-pimara-15-ène (A), 6α , 11, 12, 16-tétrahydroxy-7-oxo-Abieta-8, 11, 13-triène (B) et 2α , 19 dihydroxy-pimara-7,15-diène (C) qui ont été utilisés comme marqueurs chimiques pour la normalisation des extraits de cette plante. [123]

Beaucoup de rapports [124-129] présentent les éléments de preuve de l'utilisation de cette technique pour l'analyse des 'empreintes digitales' des drogues d'origine naturelle.

L'HPTLC a été également utilisée pour le contrôle de la pureté des produits chimiques, des stéroïdes ainsi que pour l'analyse de l'eau [130], des vitamines, des colorants alimentaires solubles dans l'eau, des pesticides dans les fruits, des légumes et autres aliments [131]. De plus, cette technique est très utile pour la détection des substances chimiques préoccupantes du point de vue médico-légale [132,133] y compris l'abus de drogues, poisons, falsifications, armes chimiques et drogues illicites.

Les laboratoires cliniques ont également bénéficiés des avantages de l'HPTLC. *Mennickent et al.* [134] ont développé une méthode pour la détermination quantitative de la fluoxétine dans le sérum humain; une méthode qui peut être utilisée pour surveillance des concentrations de ce médicament dans le sérum et

afin d'obtenir des informations sur l'adhésion des patients au traitement.

Jain et al. [135] ont mis au point une autre méthode pour la détermination de la minocycline dans le plasma humain. *Le Roux et al* [136] ont évalué une technique HPTLC pour la détermination des taux sériques du salbutamol pour des essais cliniques et l'ont établi comme méthode appropriée pour analyser des échantillons à partir du sérum.

Beaucoup de lipides ont également été analysés et étudiés à l'aide de l'HPTLC. [137]

A l'heure actuelle, cette technique est vivement recommandée pour l'analyse des médicaments dans le sérum et autres tissus. [138]

Tableau III – Quelques applications de l'HPTLC pour l'analyse pharmaceutique

Principe actif	Classe pharmacologique	Références
Lamivudine/stavudine/névirapine	Antirétroviral	[20]
Clopidogrel	Antiagrégant plaquettaire	[21]
Chlorhydrate de lévocétirizine	Antihistaminique H1	[24]
Nébivolol	Bêtabloquant	[25]
Paracétamol/piroxicam	Antipyrétique /AINS	[26]
Dexibuprofène	AINS	[29]
Famotidine/dompéridone	Anti-sécrétoire gastrique /antiémétique	[32]
Rispéridone	Neuroleptique	[33]
Duloxétine	Antidépresseur	[34]
Clotrimazole	Antifongique	[36]
Lamivudine/zidovudine	Antirétroviral	[39]
Sulfamethoxazole/triméthoprime	Antibiotique	[40]
Isoniazide/rifampicine	Antibiotique	[41]
Ibuprofène	AINS	[115]
Artémisinine	Antipaludique	[44]
Rabéprazole/dompéridone	Antiulcéreux/antiémétique	[45]
Telmisartan/ramipril	Antihypertenseurs	[47]
Atovastatine/ezetimibe	Hypocholestérolémiant	[48]
Fluconazole	Antifongique	[51]
Pipérine	Antitussif	[54]
Amboxol hydrochloride	Expectorant	[55]
Ofloxacin/ Ornidazole	Antibiotique /antiparasitaire	[116]
Chlorhydrate de propranolol	Bêtabloquant	[117]
Olanzapine	Neuroleptique	[118]
Oméprazole	Anti-sécrétoire gastrique	[119]
Paracétamol /Diclofénac/	Antipyrétique/AINS/	[120]
Famotidine	anti-sécrétoire gastrique	
Etoricoxib/thiocolchicoside	AINS/ myorelaxant	[121]
Diazépam	anticonvulsivant /hypnotique / tranquillisant	[122]
Lamivudine/stavudine/névirapine	Antirétroviral	[114]
Lamivudine/tenofovir	Antirétroviral	[53]
Emtricitabine/tenofovir	Antirétroviral	[37]

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Matériels

II.1.1. Matières premières et spécialités pharmaceutiques

Nous avons travaillé avec l'étalon de dihydrate d'azithromycine fourni par la société Promopharm.SA, Maroc (n° de lot FA 949, date de péremption 07 -13). Les spécialités pharmaceutiques ont été approvisionnées du marché Marocain. Deux spécialités, un princeps sous forme de sachets et un générique sous forme de comprimés contenant respectivement 100 mg et 500 mg de dihydrate d'azithromycine, ont fait l'objet de notre travail.

Tableau IV - Tableau récapitulatif des spécialités étudiées

Spécialité pharmaceutique	Nature	Laboratoires	N° de lot	Date de péremption
ZITHROMAX ®.	Princeps	Pfizer	A3964121	05 -2013
AZIMYCINE ®	Générique	Promopharm	12001	12 -2017

II.1. 2. Réactifs

- L'acide sulfurique 18M de marque Merck référence 3656327 ;
- Le chloroforme de marque BDH limited référence 6441030 ;
- L'éthanol de marque Merck référence 1.11727.2500 ;
- Le méthanol de marque Panreac quimica SA référence 361091,1612 ;
- L'ammoniac 25% de marque Riedel-de haen référence 20850.

II.1.3. Appareillage

Comme cette technique (HPTLC) n'est pas encore très connue auprès de la communauté scientifique marocaine d'une part ; et d'autre part, selon nos connaissances, nous sommes les seuls au Maroc à en disposer. Pour ces deux raisons, nous avons jugé judicieux de développer les composants de celle-ci afin de mieux comprendre son fonctionnement.

La station d'analyse HPTLC-CAMAG[®] a sein du « Plateau Technique Central de Recherche de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat » comporte :

- 1° un déposeur automatisé d'échantillons « ATS 4 » ;
- 2° une chambre de développement automatique « ADC2 » équipée d'une chambre en verre à double compartiment (20x10 cm) tapissée de papier filtre ;
- 3° un densitomètre « TLC Scanner 3 » ;
- 4° un ordinateur équipé d'un logiciel « WinCats » pour le contrôle à distance de tous les paramètres chromatographiques. Il permet d'avoir un rapport complet sur toutes les données enregistrées.

▪ Le déposeur automatisé d'échantillons (ATS 4)

L'ATS 4 « Automatic TLC Sampler 4 » permet l'application entièrement automatique pour des analyses qualitatives et quantitatives. Il est adapté à une utilisation de routine et un débit d'échantillons élevé dans une analyse de masse.



Figure13. Le déposeur d'échantillons (ATS 4)

▪ **La chambre de développement automatique (ADC 2)**

L'ADC2 « Automatic Developing Chamber ADC 2 » est la première chambre complètement automatique qui permet la programmation et le suivi de la totalité des paramètres de la migration, de la saturation de la cuve au séchage complet de la plaque. Il suffit de mettre dans l'appareil le solvant de migration, la plaque sur laquelle on a déposé les échantillons, et éventuellement le solvant de pré-conditionnement. Le contrôle de l'humidité relative de la plaque est particulièrement efficace et permet une parfaite reproductibilité. L'ajustement de l'humidité de la plaque à la valeur programmée ne prend que quelques minutes. Ce système est conçu pour effectuer le développement dans une chambre en verre à deux compartiments et par conséquent les méthodes de migration existantes sont directement transposables.

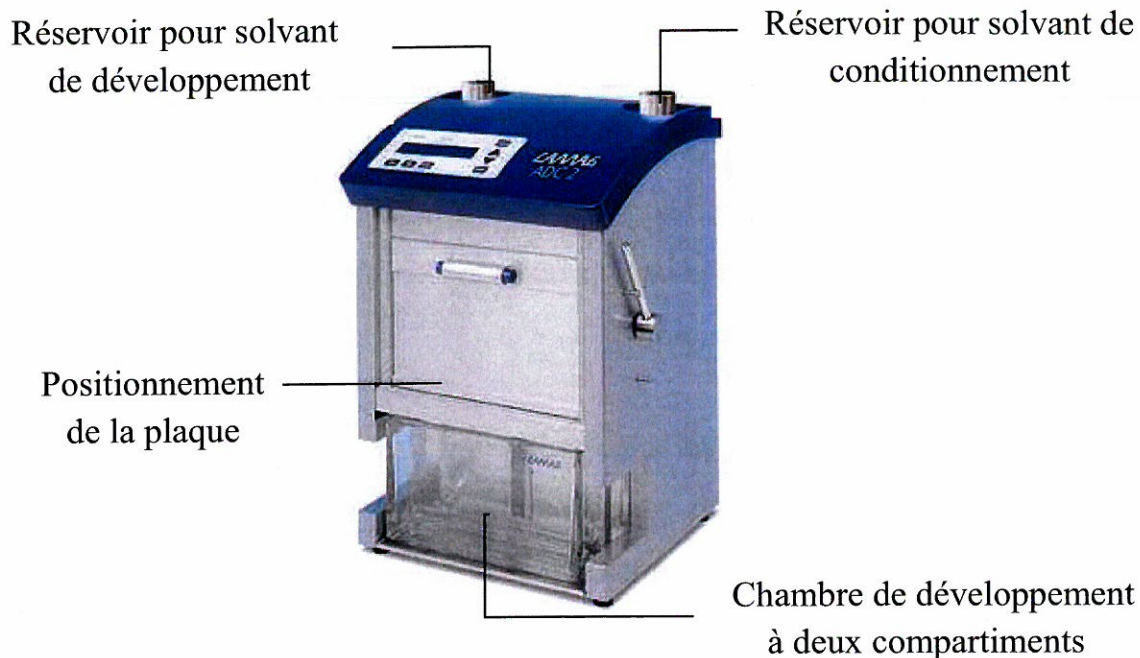


Figure 14. La chambre de développement automatique (ADC 2)

▪ **Le densitomètre (TLC Scanner 3)**

Le « scanner TLC 3 » est conçu pour l'évaluation densitométrique des chromatogrammes sur couche mince. Toutes les fonctions du scanner sont automatiques, seul le positionnement de la plaque est effectué manuellement.



Figure15. Le scanner TLC

II.1. 4. Autres

Nous avons également utilisé :

- Une balance électronique de précision ;
- Une seringue jetable et un filtre à seringue de porosité 0,45 μm ;
- Une étuve et une verrerie volumétrique adéquate.

II. 2. Méthodes

La méthode d'analyse de l'azithromycine dans les formes pharmaceutiques par HPTLC exige en premier lieu la connaissance de la nature de l'échantillon à analyser, à savoir principalement, sa structure, sa polarité, sa stabilité et sa solubilité. Tous ces paramètres ont été détaillés dans la partie « Introduction ». Compte tenu de ses informations et en se basant sur les données issues de la littérature (140-143) que le choix de la phase stationnaire et des solvants utilisés pour la phase mobile, la détermination des conditions opératoires et des paramètres de dérivation et de détection ont été établis.

La procédure suivie pour le développement et la validation de la méthode établie pour détermination de l'azithromycine par HPTLC est décrite comme suit :

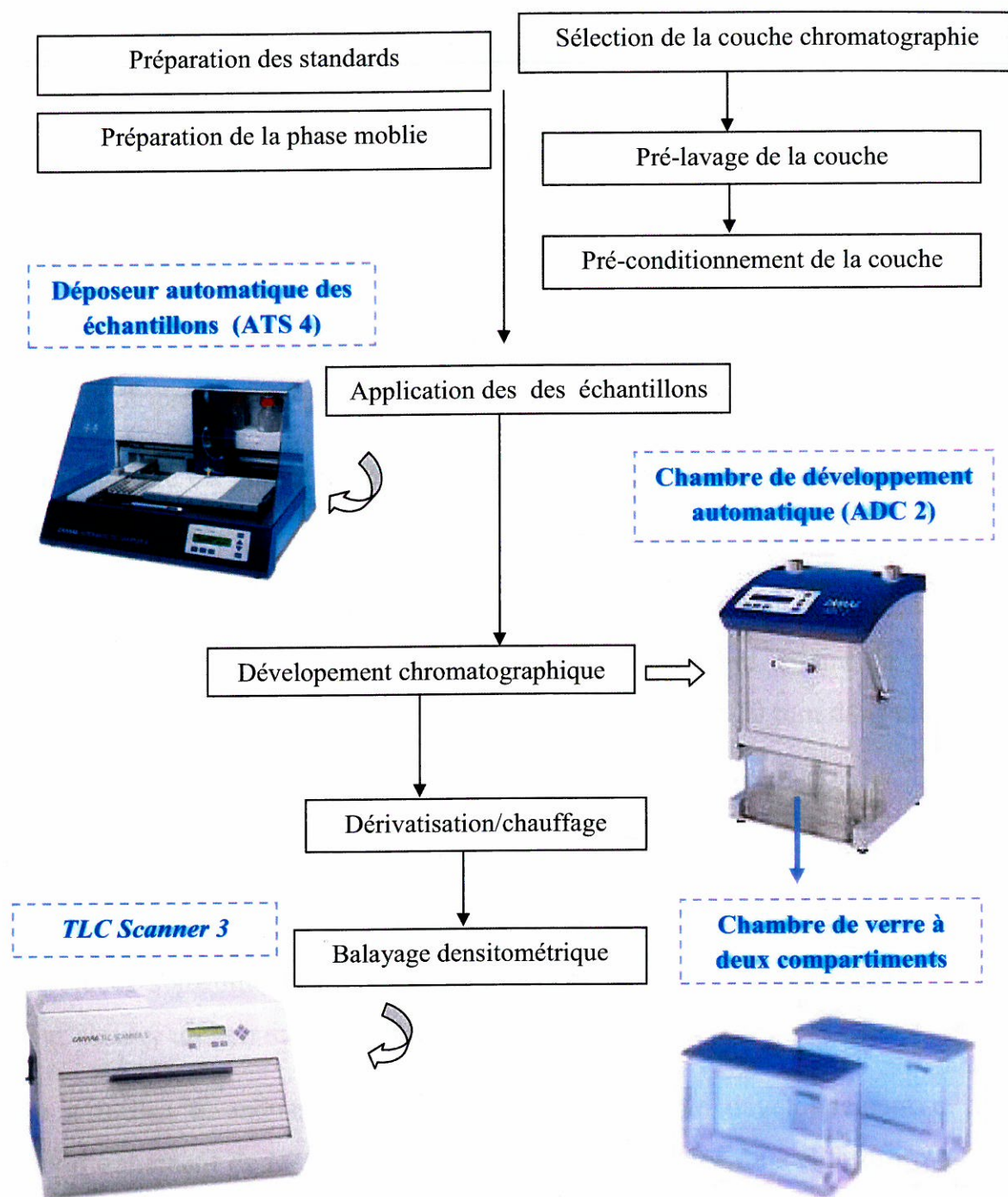


Figure16. La procédure suivie pour l'analyse de l'azithromycine par HPTLC

II. 2.1. Conditions chromatographiques

II.2.1.1 La sélection de la phase stationnaire

La chromatographie a été réalisée sur des plaques de gel de silice 60 F254 pour HPTLC (20 x 10 cm) de marque « Merck ».

II.2.1.2. La préparation de la plaque

En HPTLC, avant de démarrer une analyse il est indispensable de s'assurer de l'état de propreté du support CCM.

Un prélavage est alors recommandé. Il supprime les traces, la poussière ou tout autre contaminant.

Les couches ont été prélavées avec 20 ml de méthanol dans la chambre de verre à double compartiment. Dès que le front du solvant atteint la position prédéfinie, les plaques sont retirées puis séchées pendant 20 min dans une étuve à 120 ° C pendant 10 min .

II.2.1.3. La préparation de la phase mobile

Des mesures volumétriques précises des composants de la phase mobile ont été effectuées séparément et avec précision dans une verrerie volumétrique adéquate pour assurer un bon mélange du contenu.

On a utilisé le même mélange de solvants pour le développement et le pré-conditionnement de la plaque. Ce mélange est constituée de « chloroforme-éthanol-ammoniac 25% » (12: 28: 0,4 ; v/v/v) [10 ml pour le développement et 25 ml pour le pré-conditionnement et saturation].

II.2.1.4. La préparation des solutions pour la validation de la méthode

D'après le protocole de la stratégie de validation proposée par la SFSTP [144], il faut d'abord préparer une gamme d'étalonnage sans matrice (standards de calibration) qui sert à calculer la fonction de réponse de la méthode. Cette gamme d'étalonnage porte sur j niveaux de concentration représentant le domaine de concentration à étudier. Pour calculer les caractéristiques de la méthode, on prépare aussi une gamme de validation sur des échantillons de l'azithromycine (standards de validation) avec les mêmes niveaux de concentration que la gamme d'étalonnage. Comme il est impossible d'obtenir les excipients nécessaires pour la reconstitution de l'échantillon dans une matrice, la gamme de validation est préparée à partir d'une préparation pharmaceutique commercialisée (princeps).

II.2.1.4.1. Standards de calibration

Une solution mère d'azithromycine a été préparée par dissolution dans 10 ml d'éthanol d'une quantité pesée approximative de 10 mg de substance chimique de référence d'azithromycine. Ensuite, des dilutions successives ont été réalisées en vue d'obtenir plusieurs solutions filles aux niveaux de concentration tels que mentionnés dans le tableau V. Ces solutions ont été utilisées comme standards de calibration (SC). Trois répétitions ($n=3$) ont été préparées pour chaque niveau de concentration ($k=5$). L'ensemble de l'étape de préparation a été répété pendant trois jours ($p=3$). Ces solutions ont été utilisées comme standards de calibration (SC).

II.2.1.4.2. Standards de validation

Les standards de validation (SV) ont été préparés selon la même méthodologie d'expérience des standards de calibration en prenant une prise d'essai de la poudre du princeps contenant l'équivalent de 10 mg d'azithromycine.

II.2.1.5. Application des échantillons (ATS4)

Les échantillons sont appliqués automatiquement sous forme de bandes étroites par pulvérisation (Fig.17) . L'échantillon est contenu dans une seringue, qui est vidée par un moteur. Un courant d'un gaz inerte comme l'azote autour du bout de la seringue pulvérise l'échantillon et crée une bande sur la plaque si la seringue ou la plaque se déplace linéairement.

Positionnement des dépôts :

- Distance à partir des bords latéraux gauche et droit : 15 mm.
- Distance du bord inférieur : 8 mm.
- Longueur des bandes : 6 mm.
- Distance entre les centres des bandes : 12 mm

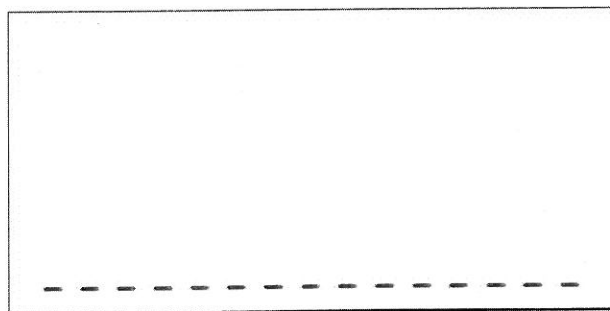


Figure 17. Image obtenue grâce au logiciel « wincats » qui montre le positionnement des dépôts appliqués par pulvérisation avec un flux d'azote.

Tableau V – Quantité d'azithromycine (en μg) en fonction de volume du dépôt (en μl).

Track	Position d'appl.	Vol d'appl. (μl)	Qt d'AZT (μg)
1	15.0	2	2
2	27.1	2	2
3	39.2	2	2
4	51.3	4	4
5	63.4	4	4
6	75.5	4	4
7	87.6	6	8
8	99.7	6	8
9	111.8	6	8
10	123.9	8	10
11	136.0	8	10
12	148.1	8	10
13	160.2	10	12
14	172.3	10	12
15	184.3	10	12

II.2.1.6. Développement chromatographique (ADC 2)

Un développement linéaire ascendant a été réalisé dans la chambre à double compartiment tapissée d'un papier filtre après saturation et pré-conditionnement avec la vapeur du solvant de développement pendant 10 min. La distance de migration était de 70 mm (20 minutes). Dès que le front du solvant atteint la position prédéfinie, la plaque a été retirée du solvant et séchée pendant 5 min.

II.2.1.7. Pulvérisation

Solvant de pulvérisation est constituée d'un mélange de « acide sulfurique 18 M : éthanol » (1:17 ; v /v)

On utilise un vaporisateur manuel dont le réservoir à aérosol et le récipient en verre. Après avoir vérifié la régularité du jet, on asperge la plaque de manière régulière.

II.2.1.8. Chauffage

La plaque est portée à une température de 100 ± 5 °C dans une étuve pendant 5 minutes.

II.2.1.9. Analyse densitométrique et quantification

La quantification a été réalisée par analyse densitométrique en mode « réflexion-absorption » à une longueur d'onde de 483 nm.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Les essais réalisés dans le cadre de la validation de la méthode ont pour objectif de vérifier que l'application de la méthode développée permet de conduire à la détermination sans ambiguïté de l'azithromycine. La méthode proposée fait l'objet d'une validation suivant le 'guide de validation analytique' publié dans la revue STP Pharma Pratique (144) et les lignes directrices de l'ICH Q2(R1) (145). Le traitement statistique a été effectué à l'aide de l'Excel 2007.

III.1. Validation de la méthode HPTLC de dosage de l'azithromycine selon l'approche classique (ICH 94, SFSTP 92)

III.1.1. Sélectivité (Spécificité)

La sélectivité d'une méthode définit son aptitude à faire la différence entre l'analyte étudié et les composants de l'échantillon pouvant interférer avec celui-ci. La spécificité de la méthode développée est établie par comparaison des chromatogrammes des échantillons contenant la substance à doser avec des spectres de solutions standards. Les bandes obtenues sont confirmées en comparant les valeurs des R_f.

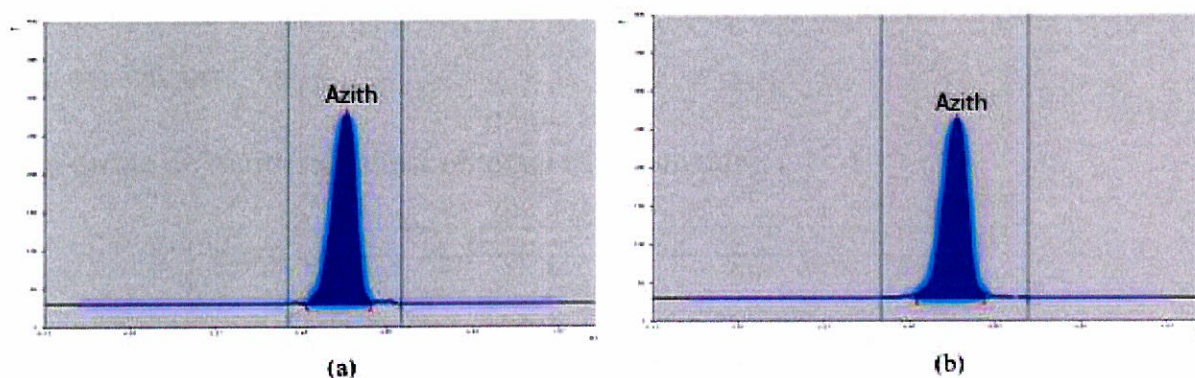


Figure 18. Chromatogrammes spécifique à l'azithromycine obtenus à partir d'une solution SC (a) et d'une solution SV (b) à la concentration 1 µg/zone après balayage densitométrique à 483nm.

Les chromatogrammes obtenus avec la solution contenant l'échantillon et la solution du standard sont semblables et aucun pic interférant avec celui de l'azithromycine n'a été enregistré au niveau du R_f.

Les Rf calculés à partir de la solution contenant l'échantillon et de la solution du standard sont de 0,53 et 0,54 ; respectivement.

Cette méthode permet donc l'analyse univoque de l'azithromycine même en présence de la matrice (qui constitue la spécialité pharmaceutique dans notre étude) ce qui justifie sa spécificité.

III.1.2. Linéarité

La linéarité permet de démontrer qu'il existe une relation linéaire entre les réponses et la concentration en azithromycine des solutions réalisées.

La linéarité a été évaluée à partir de 5 concentrations niveaux de concentration (0,2 ; 0,4; 0,6 ; 0,8 et 1 $\mu\text{g}/\text{zone}$) avec 3 répétitions indépendantes pour chacune de ces valeurs.

La droite de régression ainsi obtenue est la suivante :

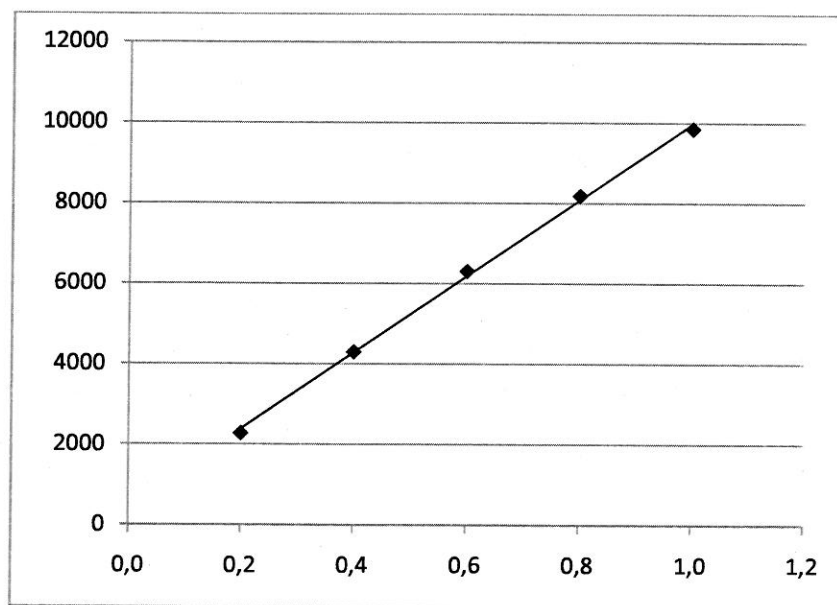


Figure 19. Droite de calibration

L'équation de la droite de calibration : $y = 9504 x + 477,1$

Où y est la concentration introduite en $\mu\text{g}/\text{zone}$ et x est l'aire sous la courbe.

Le coefficient de détermination r^2 est égal à **0,999** ce qui signifie que la concentration de l'échantillon est dépendante à **99,90%** des surfaces mesurées.

L'analyse de variance de la régression permet de vérifier l'existence d'une pente significative, l'existence d'une ordonnée à l'origine et la validité de l'ajustement de la droite.

III.1.2.1. Test d'homogénéité des variances

Le test de Cochran est appliqué aux variances des réponses y_{ij} (aire) pour vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale. Si l'inégalité suivante est vérifiée : $C \text{ calculé} < C \text{ tabulé } (\alpha ; k ; n-1)$, l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque $\alpha = 0,05$.

$C \text{ calculé} = \mathbf{0,145}$

$C (0,05 ; 5 ; 14) = \mathbf{0,684}$

$C_{\text{calculé}} < C_{\text{tabulé}}$; donc les variances sont homogènes avec 5% de chances qu'il y ait une différence significative des variances.

III.1.2.2. Test de l'existence d'une pente significative (F1)

La dépendance linéaire est testée par le test F de Fisher au seuil de confiance de 95%. Si le test n'est pas significatif, la pente est nulle. Par contre, si celui-ci est significatif, la pente est différente de 0. Si le F calculé est supérieur au F de la

table aux degrés de liberté (1, N-2), N étant le nombre total d'observations (ici 15), le test est significatif.

$$F_{\text{calculé}} = 6487$$

$$F_{(0,05 ; 1 ; 13)} = 4,67$$

$F_{\text{calculé}} \gg F_{\text{tabulé}}$, la pente est significative, c'est-à-dire différente de 0. Donc on a une dépendance linéaire au seuil de risque 5%.

III.1.2.3. Test de validité de la droite d'ajustement (F2)

Le test de validité de la droite d'ajustement est réalisé par un test de F de Fisher. Si le critère F calculé est inférieur au F de la table aux degrés de liberté (α ; k-2 ; N-k), le test n'est pas significatif. La dispersion due à l'ajustement de la droite est considérée comme valide.

$$F_{\text{calculé}} = 71,66$$

$$F_{(0,05 ; 3, 10)} = 3,71$$

Puisque $F_{\text{calculé}} \gg F_{\text{tabulé}} (0,05 ; 3, 10)$, le test est donc significatif et l'ajustement est considéré comme non valide au seuil de risque 5%.

III.1.2.4. Test d'existence de l'ordonnée à l'origine

Un test de Student est effectué pour déterminer si la droite de régression passe par l'origine. Si le critère calculé est supérieur au t de la table de Student à (N-2) degrés de liberté (13 dans notre cas), le test est significatif et la valeur de l'ordonnée à l'origine est considérée comme statistiquement différente de 0.

$$t_{\text{calculé}} = 6,22$$

$$t_{(0,05 \ 13)} = 2,16$$

Comme $t_{\text{calculé}} > t_{\text{tabulé}}$, on conclut que la droite ne passe pas par l'origine au seuil de risque 5%, dans ce cas on établit la droite d'étalonnage à partir de deux points (au minimum) pour les prochains dosages.

III. 1.3. Fidélité ou précision

La fidélité de la méthode de dosage est exprimée par le coefficient de variation (% CV) obtenu en effectuant le rapport entre l'écart-type et la moyenne des réponses. La répétabilité (fidélité intra-jour) et la fidélité intermédiaire (fidélité inter-jour) ont été observées à trois concentrations (0.2 ; 0.6 et 1 $\mu\text{g}/\text{zone}$).

La méthode sera considérée comme fidèle si les CV de la répétabilité sont inférieurs à 2%.

- Pour la répétabilité ($n = 3$), le CV est **0,72%**.
- La fidélité intermédiaire ($n = 9$), le CV est de **4,19 %**.

Compte tenu des valeurs obtenues de CV, la répétabilité de la méthode est jugée satisfaisante, mais la fidélité intermédiaire n'est pas satisfaite (supérieure à 2%).

III.1.4. Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur de la concentration réelle d'un échantillon reconstitué et la valeur de concentration mesurée par dosage.

L'étude est effectuée sur l'ensemble des mesures brutes. Cet ensemble est transformé en un ensemble de rendements : la concentration calculée est divisée par la concentration réelle, multipliée par cent.

Une méthode est considérée exacte quand la valeur 100% est incluse dans l'intervalle de confiance.

Tableau VI - Résumé des données d'exactitude

Conc. réelles (µg/zone)	Conc. calculées (µg/zone)	Recouvrement moyen (%)
0,20	0,189	94,38
0,40	0,406	101,49
0,60	0,613	102,126
0,80	0,817	102,08
1,00	0,985	98,80

L'intervalle de confiance IC est égale **99,78 % ± 1,67** qui peut aussi être écrit sous forme **[98,11% ; 101,45 %]**. On peut conclure qu'il existe 95% de chance que la vraie valeur (100%) soit incluse dans cet intervalle. La méthode est considérée comme exacte.

III.1.5. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

La limite de détection (LD) est la plus petite quantité de la substance ciblée qui peut être détectée, mais pas exactement quantifiée dans un échantillon.

La limite de quantification inférieure (LQ) est la plus petite quantité de la substance ciblée dans un échantillon qui peut être déterminée dans des conditions expérimentales prescrites avec une exactitude bien définie.

Les valeurs de la limite de détection et de quantification sont respectivement de **0,0467** et **0,141** µg/zone.

CONCLUSION

La validation de la méthode étudiée a permis de conclure que celle-ci n'est pas précise (CV_{FI} est largement supérieur à 2 %) et que l'ajustement n'est pas valide au seuil de probabilité considéré ($p < 0,05$), donc notre méthode peut être jugée invalide selon les normes ICH 94 et SFSTP 92.

III.2. VALIDATION DE LA METHODE HPTLC DE DOSAGE DE L'AZITHROMYCINE SELON LA NOUVELLE APPROCHE SFSTP 2003 (PROFIL D'EXACTITUDE)

III.2.1. Stratégie du profil d'exactitude

Dans l'étude présente, nous avons appliqué une nouvelle stratégie basée sur l'intervalle de tolérance d'espérance β de l'erreur totale d'une mesure, erreur qui prend en compte la justesse (biais) et la fidélité intermédiaire (écart-type). Comme précédemment mentionné dans la partie introductive, cette stratégie présente la possibilité de contrôler le risque d'acceptation d'une méthode non adéquate et ce, au moyen des profils d'exactitude. Un autre avantage présenté par cette stratégie est de fournir la garantie que les résultats des mesures qui seront obtenus lors de l'application future de la méthode validée seront inclus dans les limites d'acceptation fixées à priori selon les exigences définies. En conséquence, le profil d'exactitude peut être considéré comme un outil de décision très utile pour accepter ou rejeter une méthode selon son usage prévu. De plus, le profil d'exactitude peut être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration, pour déterminer les limites de quantification et subséquemment pour sélectionner l'intervalle de concentration pour le dosage.

D'un point de vue pratique, cette stratégie de validation peut se résumer en six étapes reprises ci-après :

Etape 1 : sélection des limites d'acceptation considérant l'usage attendu de la méthode ;

Etape 2 : ajustement d'un modèle de régression à partir des standards de calibration ;

Etape 3 : calcul des concentrations des standards de validation à partir du modèle sélectionné ;

Etape 4 : détermination du biais moyen à chaque niveau de concentration ;

Etape 5 : calcul des limites de tolérance bilatérales pour les résultats attendus au niveau β à chaque niveau de concentration en considérant le biais et l'écart-type de fidélité intermédiaire ;

Etape 6 : établissement du profil d'exactitude, représentant comme fonction de la concentration, le biais moyen, l'intervalle de tolérance des valeurs attendues au niveau β et les limites d'acceptation.

III.2.2. Analyse de la fonction de réponse et sélection du modèle de régression approprié

Cette étape constitue l'une des plus importantes du fait que la fiabilité des résultats de validation qui seront obtenus dépend du modèle de régression sélectionné. Comme il s'agit d'un dosage de principe actifs dans des formes pharmaceutiques, les limites d'acceptation ont été fixées à 5 % [73]. Dès que l'intervalle de tolérance dépasse les limites d'acceptation, la méthode utilisée ne répond plus aux objectifs fixés initialement : elle n'est plus valide.

Deux modèles de régression , le modèle linéaire ($y = ax + b$) et le modèle quadratique (équation du second degré $y = ax^2 + bx + c$), ont été ajustés au

moyen du logiciel Excel 2007 en vue d'analyser la relation entre la concentration en azithromycine et la réponse analytique (l'aire sous la courbe) et de décider lequel est le plus approprié.

D'après les résultats obtenus, le modèle qui possède le meilleur profil d'exactitude correspond à une droite de régression polynomiale de 2^{ème} degré.

En considérant le modèle linéaire et prenant un risque de 5 % (fig. 1- annexe 4), nous avons constaté que les intervalles de tolérance se trouvent en dehors des limites d'acceptation pour le premier et le troisième niveau de concentration (0,2 et 0,6 µg /zone, respectivement) .

III.2.3. Résultats de la validation du modèle sélectionné

La fonction de réponse a été évaluée au moyen de trois courbes de calibration construites à partir des standards de calibration utilisant 5 niveaux de concentration de 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 µg/zone (fig.20). Les concentrations des standards de validation ont été calculées à partir de chaque courbe obtenue, ce qui a permis d'obtenir pour chaque niveau de concentration le biais relatif moyen, les limites de tolérance supérieures et inférieures des valeurs attendues au niveau β et ce, en considérant l'écart-type pour la fidélité intermédiaire. Ensuite, le profil d'exactitude a été construit à partir de ces données .

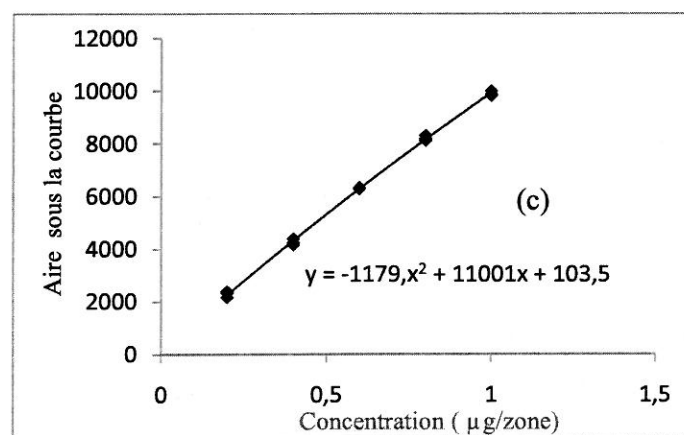
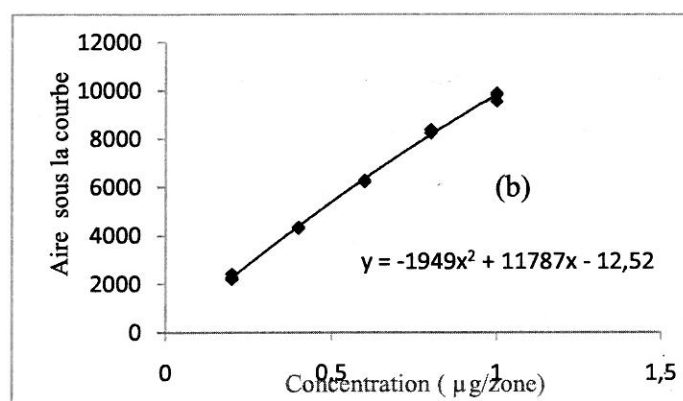
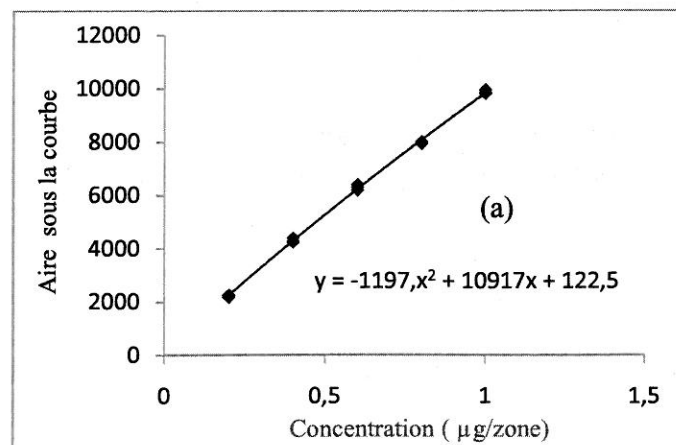


Figure 20. Droites d'étalonnage construites par le modèle quadratique passant par 5 niveaux de concentration : a : série 1 (premier jour) ; b : série 2 (deuxième jour) ; c : série 3 (troisième jour).

III.2.3.1. Justesse

La justesse est exprimée en termes de biais (en $\mu\text{g}/\text{zone}$) ou de biais relatif (%) et a été estimée au moyen des standards de validation à cinq niveaux de concentration (de 0,2 à 1 $\mu\text{g}/\text{zone}$).

Comme le montre le tableau VII, les biais relatifs de la méthode développée ont été trouvés acceptables puisqu'ils sont aux compris entre -2,20 et 2,02 % et que les récupérations sont comprises entre 98,48 et 102,9 %.

Tableau VII - Justesse de la méthode

Niveaux de concentration ($n = 3, p = 3$)	Biais absolu ($\mu\text{g}/\text{zone}$)	Biais relatif (%)
0,2 $\mu\text{g}/\text{zone}$	0,00099205	0,49602
0,4 $\mu\text{g}/\text{zone}$	0,00012592	0,03148
0,6 $\mu\text{g}/\text{zone}$	0,00107659	0,17943
0,8 $\mu\text{g}/\text{zone}$	0,01152183	1,44022
1,0 $\mu\text{g}/\text{zone}$	-0,00311138	-0,31113

III.2.3.2. Fidélité

La fidélité a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en validation.

Comme montré dans le tableau VIII, les coefficients de variation de répétabilité (qui reflètent la fidélité intra-jour) ainsi que coefficients de variation de la

fidélité intermédiaire (qui reflète la fidélité inter-jour) pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 1,10 %, ce qui démontre l'excellence de la fidélité de la méthode de HPTLC développée.

Tableau VIII - Fidélité de la méthode

Niveaux de concentration ($n = 3, p = 3$)	Répétabilité (CV %)	Fidélité intermédiaire (CV %)
0,2 µg/zone	1,095	1,095
0,4 µg/ zone	0,874	1,012
0,6 µg/ zone	0,917	0,957
0,8 µg/ zone	0,568	0,568
1,0 µg/ zone	0,815	0,481

III.2.3.3. Exactitude

L'exactitude tient compte de l'erreur totale liée au résultat, c'est-à-dire des erreurs systématique et aléatoire.

L'exactitude de la méthode est représentée à partir du profil d'exactitude tel qu'illustré à la figure 21. Au vu des résultats présentés dans le tableau IX, la méthode HPTLC proposée est exacte étant donné qu'à chaque niveau de concentration, les différentes limites de tolérance des résultats restent incluses dans les limites d'acceptation de ± 5 %.

Tableau IX - Exactitude de la méthode

Niveaux de concentration ($n = 3, p = 3$)	Limites de tolérance (en $\mu\text{g}/\text{zone}$)	Limites de tolérance (en %)
0,2 $\mu\text{g}/\text{zone}$	[0,1956290 - 0,2063550]	[97,81 - 100,49]
0,4 $\mu\text{g}/\text{zone}$	[0,3893978 - 0,4108539]	[97,34 - 100,03]
0,6 $\mu\text{g}/\text{zone}$	[0,5867328 - 0,6154203]	[97,78 - 100,17]
0,8 $\mu\text{g}/\text{zone}$	[0,8003793 - 0,8226643]	[101,04 - 101,41]
1,0 $\mu\text{g}/\text{zone}$	[0,9696756 - 1,0241015]	[96,96 - 99,68]

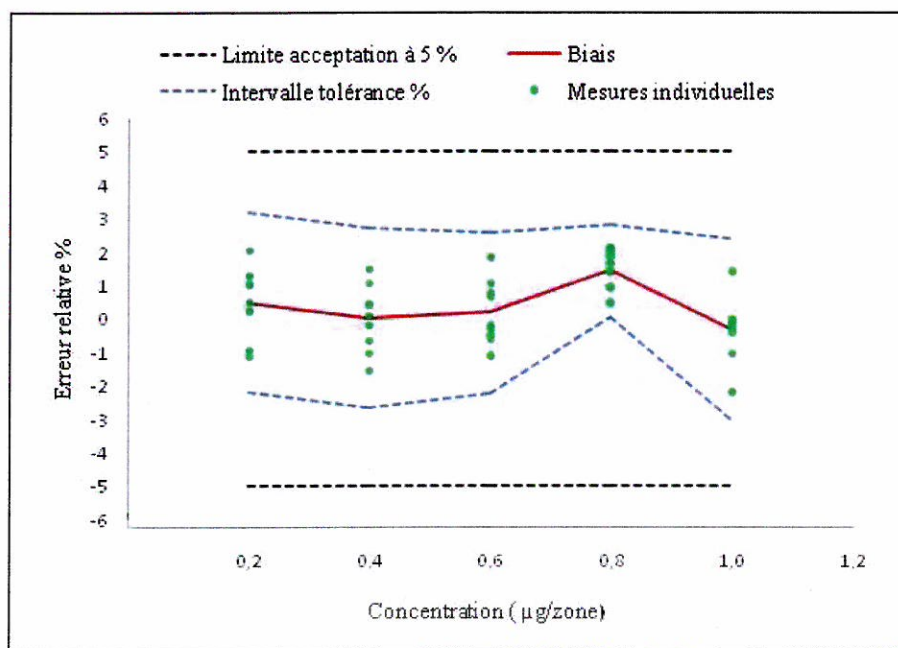


Figure 21. Profil d'exactitude obtenu avec un risque de ± 5 , en considérant le modèle de régression quadratique établi avec 5 niveaux de concentration.

III.2.3.4. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à obtenir, à l'intérieure d'un certain intervalle de dosage, des résultats (et non des signaux) directement proportionnels à la concentration (quantité) de la substance à examiner dans l'échantillon [146].

Pour toutes les séries (jours) de validation, une droite de régression a été ajustée sur les concentrations calculées par rapport aux concentrations introduites en appliquant le modèle de régression linéaire pour lequel le coefficient de détermination (r^2), la pente et l'ordonnée à l'origine sont présentés dans le tableau XI.

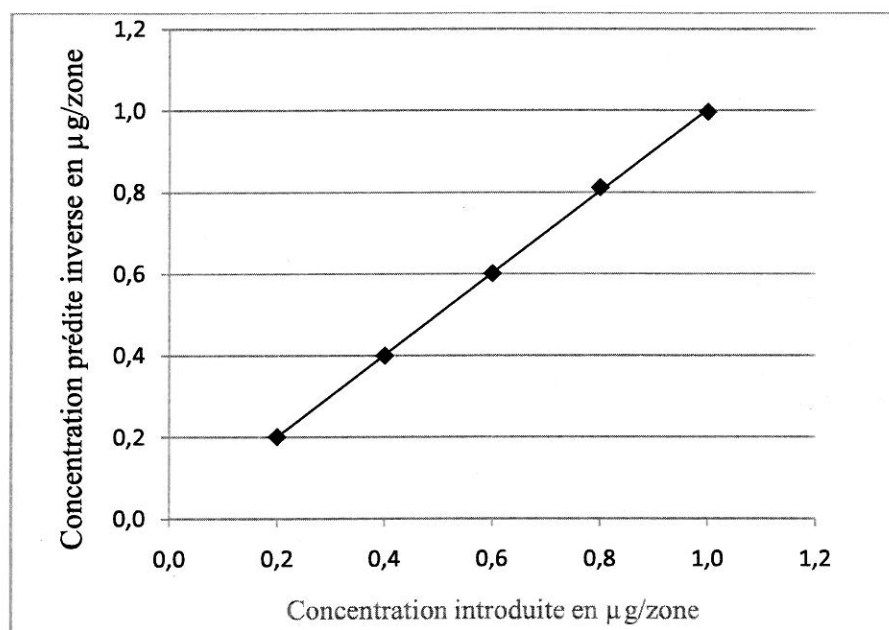


Figure 22. Relation entre les concentrations introduites et les concentrations prédites inverse.

Tableau XI - Linéarité de la méthode

$n = 3$ répétitions	<u>Intervalle de dosage (μ g/zone)</u>	0,2 - 1,0
$k = 5$ niveaux de concentration	<u>Pente</u>	1,00159
$p = 3$ séries (ou jours)	<u>Ordonnée à l'origine</u>	0,00116
$N = 45$ observations totales	<u>r^2</u>	0,9997

Dans la pratique courante, très souvent le coefficient de détermination (r^2) est utilisé erronément pour évaluer la qualité de la linéarité d'une procédure analytique. En effet, Van Loco et coll. [147] ainsi que Hibbert [148] ont mis en lumière cet aspect en démontrant que la valeur du coefficient de détermination approchant l'unité ne peut que donner une certaine approximation de la qualité de la linéarité étant donné qu'une relation curviligne pourrait aussi présenter un r^2 proche de l'unité. L'approche statistique pour l'ajustement de la droite de la linéarité en utilisant une ANOVA compare l'erreur d'ajustement (en anglais « Lack-of-Fit » ou « LOF ») à l'erreur pure (aléatoire). L'hypothèse d'un ajustement adéquat est rejetée si le rapport $F_{\text{observé}}$ qui équivaut à « LOF/Erreur pure » est supérieur à la valeur F de la statistique pour un nombre défini de degrés de liberté et un niveau de signification approprié. Toutefois, le problème de cette approche est que plus la variance est grande, plus ce rapport $F_{\text{observé}}$ est petit, et par conséquent plus il y a de chance de considérer d'une manière erronée l'ajustement comme adéquat et d'accepter la linéarité de la méthode analytique. Ainsi, cette approche ne convient pas pour évaluer la linéarité de la méthode dans le cas présent. C'est pourquoi nous avons appliqué l'approche basée sur les limites de tolérance absolues. Pour qu'une droite de régression soit démontrée

linéaire, il faudrait que les limites de tolérance absolues soient comprises dans les limites d'acceptation prédéfinies. Puisque les limites de tolérance absolues telles qu'illustrées dans la figure 23 sont comprises dans les limites d'acceptation de $\pm 5\%$, la linéarité de la méthode de HPTLC développée est ainsi démontrée.

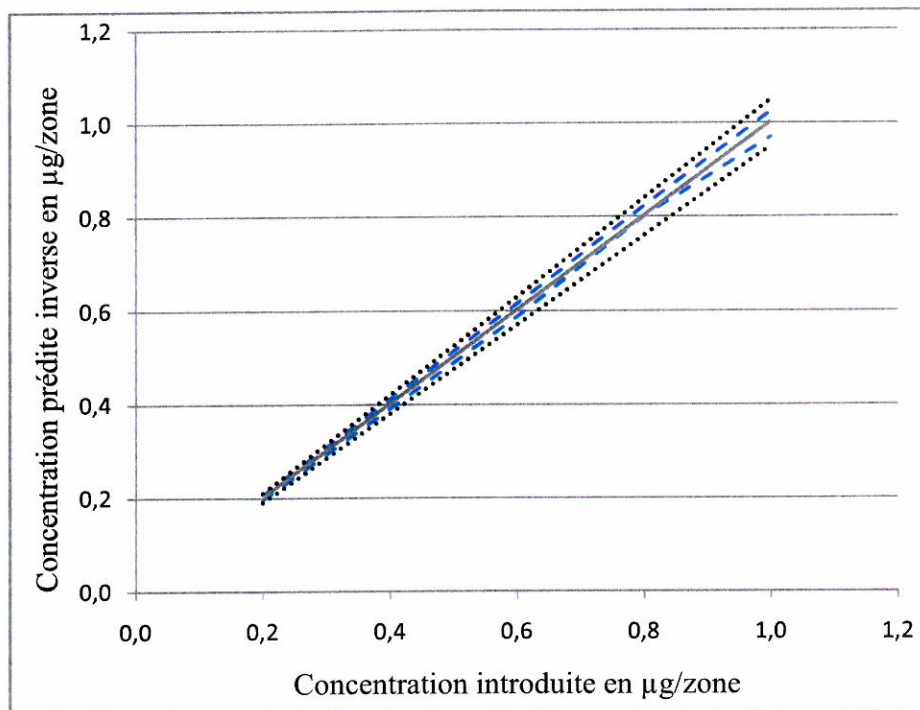


Figure 23. Graphe de la linéarité se rapportant à la méthode de HPTLC pour la détermination de l'azithromycine

—— La ligne continue grise est la droite d'équation ($y = x$) sur laquelle les points devraient se retrouver dans le cas d'une méthode validée ;

----- Les lignes en traits discontinus bleus correspondent au profil d'exactitude (limites de tolérance exprimées en valeur absolue) ;

..... Les lignes pointillées noires représentent les limites d'acceptation de $\pm 5\%$.

III.2.3.5. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

La LD a été estimée en utilisant l'ordonnée à l'origine moyenne du modèle de calibration et l'écart-type résiduel de la régression. En appliquant cette méthode de calcul, la LD de la méthode HPTLC vaut **0,052 µg/zone**.

La LQ a été obtenue en calculant la plus petite concentration en dessous de laquelle les limites d'exactitude ou les limites de tolérance sont en dehors des limites d'acceptation. Etant donné que le profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle de régression sélectionné est inclus dans les limites d'acceptation, le premier niveau de concentration (0,2 µg/ zone) qui est le niveau le plus bas investigué correspond à la limite de quantification.

IV. APPLICATION DE LA METHODE

Afin de démontrer l'applicabilité de la méthode HPTLC proposée dans ce travail, l'azithromycine a été quantifiée dans deux produits pharmaceutiques : ZITHROMAX® (sachets) et AZIMYCINE® (comprimés).

Les résultats de la détermination de l'azithromycine dans les sachets de Zithromax et les comprimés d'Azimycine présentent un pourcentage de recouvrement moyen de 99,38% et 99,87 % respectivement . Les concentrations de ces deux formulations étaient donc conformes avec les limites autorisés de $\pm 5\%$ de la valeur cible (Tableau XII) ; ce qui prouve que la méthode est adaptée pour une utilisation dans le contrôle qualité des médicaments.

Tableau XII- Résultats de la détermination de l'azithromycine dans les formulations pharmaceutiques étudiées.

Echantillons	Quantité introduite théorique (µg)	Quantité retrouvée (µg)	Recouvrement (%)
ZITHROMAX (sachets)	0,420 0,630	0,41590 0,62843	99,02 99,75
AZIMYCINE (comprimés)	0,197 0,394	0,19723 0,39259	100,11 99,64

En outre , les résultats obtenus avec la méthode décrite pour l'analyse de l'azithromycine dans les formulations pharmaceutiques ont été comparés à ceux obtenus par les méthodes décrites dans la littérature (annexes 6) . Ces résultats indiquent qu'il n'existe aucune différence significative entre les performances des méthodes en ce qui concerne l'exactitude et la précision. De plus, la méthode proposée est plus simple, rapide et peu coûteuse.

CONCLUSION

La validation montre, sur la base du modèle de régression, que les limites de tolérance à 95% sont comprises entre les limites d'acceptabilité dans un domaine de validité s'étend de 0,2 à 1,0 µg/zone, la méthode est valide dans ce domaine. En conséquence, nous avons sélectionné ce modèle de régression qui d'une part, rencontre les objectifs de la méthode et d'autre part, correspond à l'utilisation en analyse de routine.

CONCLUSION GENERALE

L'analyse qualitative et quantitative par HPTLC a aujourd'hui atteint un niveau de maturité et de performance remarquable. A l'heure actuelle, son utilisation dans l'analyse pharmaceutique est prouvée par le grand nombre d'articles publiés dans ce domaine.

Cette thèse a permis de démontrer le potentiel et les possibilités offertes par l'HPTLC via un exemple de son application pour l'analyse qualitative et quantitative de l'azithromycine.

La méthode proposée dans ce travail était sujette à la validation des paramètres. Elle présente l'intérêt d'être fiable, rapide, peu onéreuse, très simple à mettre en œuvre par rapport aux autres techniques précédemment utilisée pour l'analyse de ce principe actif.

Les performances qualitatives et quantitatives ont été évaluées. L'utilisation du gel de silice 60 F254 et un mélange (chloroforme : éthanol : ammoniac 25% ; 15: 35: 0,5 (v/v/v)) a permis une séparation optimale en vue d'une analyse qualitative et quantitative de l'azithromycine. Les valeurs R_f et les chromatogrammes enregistrés après balayage densitométrique à 483 nm pour l'azithromycine à partir des échantillons étaient comparables à ceux obtenus à partir des standards, ce qui indique l'adéquation de la méthode pour son identification.

La validation de la méthode proposée n'a pas rempli toutes les exigences de performances spécifiques conformément aux normes de l'ICH 94 et SFSTP 92, ainsi, notre méthode a été jugée spécifique et exacte mais la linéarité n'a pas pu être démontrée dans le domaine qui s'étend entre 0,2 et 1 $\mu\text{g}/\text{zone}$. De plus la fidélité n'était pas pleinement satisfaisante.

Cependant, nous avons appliqué la stratégie basée sur la notion de l'erreur totale pour confirmer ou infirmer la validité de notre méthode.

Outre l'intérêt pour la validation de la méthode, le profil d'exactitude est également un outil diagnostique pour déterminer les points faibles de la méthode. Le tracé des profils d'exactitude pour des modèles d'étalonnage variés permet de déterminer le modèle qui donnera le profil le plus en adéquation avec les objectifs scientifiques. L'hypothèse de linéarité de la fonction d'étalonnage est totalement abandonnée.

Le mode de calcul du profil, niveau par niveau, permet de couvrir une très large gamme dynamique de concentrations. On peut alors valider des méthodes dont les variances ne sont pas homogènes en fonction du niveau de concentration alors que c'est impossible avec les protocoles classiques.

Cette démarche est globale et règle enfin les conflits entre la justesse et la fidélité. Les approches classiques de validation les traitant séparément, on débouche parfois sur des conclusions ambiguës si seulement l'un des deux critères est satisfaisant. La méthode du profil d'exactitude permet de représenter simultanément, sur un même graphique, ces deux critères (ou des combinaisons de ces critères).

Dans l'exemple présenté dans notre étude, la stratégie basée sur le profil d'exactitude a été appliquée avec succès afin de démontrer l'aptitude de la méthode à quantifier l'azithromycine dans différentes préparations pharmaceutiques. Le modèle de régression polynomiale de 2^{ème} degré s'est révélé adéquat au seuil de risque de 5%. Les différents critères de validation ont été évalués et ont tous été trouvés acceptables.

Il faut donc rappeler que la validation d'une méthode d'analyse encore mal connue en se basant sur la démarche classique (ICH 94, SFSTP 92) risque d'entraîner de sérieuses déconvenues ; comme de conclure à son inefficacité alors qu'elle est bonne méthode.

Pour conclure, l'HPTLC semble d'être une solution de choix aux laboratoires d'analyse pour réduire les temps et coûts d'analyse ainsi que d'augmenter la productivité, tant du point de vue du développement de méthodes que de leur utilisation en routine. Les progrès réalisés ces dernières années au niveau de la qualité des adsorbants, des méthodes de dépôt des échantillons, du développement des plaques, de la densitométrie et l'enregistrement des chromatogrammes avec la possibilité de se combiner avec d'autres méthodes instrumentales font donc tous de la HPTLC un outil analytique puissance dans l'avenir.

RESUME

- **Titre** : Développement d'une nouvelle méthode pour le dosage de l'azithromycine par HPTLC : validation selon le concept du profil d'exactitude.

- **Auteur** : Sara ZIRAOUI

- **Rapporteur** : Professeur Abdelaziz BOUKLOUZE

- **Mots clés** : HPTLC, azithromycine, validation, profil d'exactitude.

La chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) est une forme développée de la chromatographie sur couche mince (CCM). Un certain nombre d'améliorations apporté à la méthode de base (CCM) a permis d'automatiser toutes les étapes, d'augmenter la résolution et d'obtenir des mesures quantitatives plus précises.

De nombreuses méthodes ont été développées au cours des dernières années pour le dosage de l'azithromycine mais elles nécessitent toutes un équipement important.

L'objectif de cette thèse est le développement d'une nouvelle méthode plus simple pour le dosage de l'azithromycine par HPTLC ainsi que sa validation conformément aux guidelines en vigueur ICH Q2(R1) et SFSTP 2003 (Profil d'exactitude).

Dans ce travail, des plaques de gel de silice 60 F254 avec un mélange de chloroforme-éthanol-ammoniac 25% (15:35:0,5 ; v/v/v) comme phase mobile ont été utilisés. L'analyse densitométrique a été réalisée en mode de réflexion à 483 nm. Le R_f de l'azithromycine sous ces conditions était de 0,53. La validation montre, sur la base du modèle de régression quadratique, que les limites de tolérance sont comprises entre les limites d'acceptabilité de ± 5 % dans le domaine de validité s'étend de 0,2 à 1,0 $\mu\text{g}/\text{zone}$. La méthode s'est avérée spécifique, linéaire dans ce domaine, fidèle (CV_r varie entre 0,56 à 1,1 % et CV_{FI} entre 0,48 et 1,1%) et juste (le biais varie de + 1,44 à - 0,31 %). De plus, notre méthode présente l'avantage d'être relativement rapide, simple et peu onéreuse.

SUMMARY

Title: Development of new method for the determination of azithromycin by HPTLC : validation based on the concept of accuracy profile.

- **Author:** Sara ZIRAOU

- **Reporter:** Professor Abdelaziz BOUKLOUZE

- **Key words:** HPTLC, azithromycin, validation, accuracy profile.

High performance thin layer chromatography (HPTLC) is an enhanced form of thin layer chromatography (TLC). A number of enhancements can be made to the basic method of TLC to automate the different steps, to increase the resolution achieved and to allow more accurate quantitative measurements.

Many assays have been recently developed for the determination of azithromycin but require special apparatus.

The purpose of this thesis is to develop a simple new method for the determination of azithromycin by HPTLC and validate it according to guidelines ICH Q2(R1) and SFSTP 2003 (accuracy profile).

In this study, Silica gel plates with fluorescence indicator F254 were used with chloroform-ethanol-25% ammonia 6:14:0.2 (v/v/v) as mobile phase. Densitometric analysis was carried out in reflection mode at 483 nm. The R_f of azithromycin under these conditions was 0.53 .

The validation , based on the regression quadratic model , shows that limits of tolerance are included between limits of acceptability of $\pm 5 \%$ in the domain of validity which extends from 0,2 to 1,0 $\mu\text{g}/\text{zone}$.

The assay proved to be specific ,linear in this domain, precise (CV_r from 0,56 to 1,1 % and CV_{PI} from 0,48 to 1,1%) and accurate . This chromatographic method presents the advantage to be relatively fast, simple and inexpensive.

ملخص

العنوان: تطوير طريقة جديدة للتحليل الكمي للأزيتروميسين بواسطة "الكروماتوجرافيا على طبقة رقيقة عالية الأداء" (HPTLC) والتحقق من صحتها وفقا للمبادئ التوجيهية SFSTP 2003

الكاتب: سارة الزراوي

المقرر: الأستاذ عبد العزيز بوكروز

الكلمات الرئيسية: HPTLC ، تحليل الأدوية، أزيتروميسين، التحقق من صحة التحليل.

الكروماتوجرافيا على طبقة رقيقة عالية الأداء (HPTLC) High Performance Thin Layer Chromatography هي شكل متطور من اشكال الكروماتوجرافيا على طبقة رقيقة (Thin Layer Chromatography (TLC). لقد أمكن إجراء عدد من التحسينات على المنهج الأساسي للـ(TLC) من مكننة مختلف الخطوات التجريبية والحصول على قياسات كمية أكثر دقة. قد تم تطوير العديد من التقنيات في السنوات الأخيرة للتحليل الكمي لهذا العنصر لكنها تتطلب معدات خاصة و مكلفة.

الهدف من هذه الأطروحة هو تطوير طريقة للتحليل الكمي لـ(الأزيتروميسين) باستخدام تقنية HPTLC والتحقق من صحة الطريقة التحليلية المستخدمة المستخدمة وفقا للمبادئ التوجيهية SFSTP 2003 و ICH Q2(R1). في هذه الدراسة استخدمت صفائح السليكا- جل Silica Gel 60 F254 كطور ثابت، في حين استخدم مزيج من (الكلوروفورم إيثانول أمونيا 25% ; 6 : 14: 0.2 v/v/v) كطور متحرك. سجلت الكثافة الضوئية لكل عينة عن طريق الإنعكاس الضوئي على الطول الموجي 483 نانومتر. قيمة Rf للأزيتروميسين في ظل هذه الظروف التجريبية هي 0,53. أثبت أن الطريقة التحليلية المعتمدة دقيقة، خطية على مجال القياس بين 0,2 -1 ميكروغرام / منطقة ، ومضبوطة. تمتاز هذه الطريقة بأنها بسيطة، سريعة وغير مكلفة.

ANNEXES

ANNEXE 1 - Standards de validation

ID. Ech	Série	Niveau	Quantité en µg	Aire sous la courbe
Val01	1	1	0,2	2262,8
Val02	1	1	0,2	2279,9
Val03	1	1	0,2	2235,2
Val04	1	2	0,4	4316,8
Val05	1	2	0,4	4315,1
Val06	1	2	0,4	4358,4
Val07	1	3	0,6	6304,9
Val08	1	3	0,6	6215,6
Val09	1	3	0,6	6345,5
Val10	1	4	0,8	8191,1
Val11	1	4	0,8	8224,6
Val12	1	4	0,8	8213,3
Val13	1	5	1	9819,2
Val14	1	5	1	9805,9
Val15	1	5	1	9833,6
Val16	2	1	0,2	2289,3
Val17	2	1	0,2	2296,2
Val18	2	1	0,2	2278,6
Val19	2	2	0,4	4348,6
Val20	2	2	0,4	4383
Val21	2	2	0,4	4364,4
Val22	2	3	0,6	6344,4
Val23	2	3	0,6	6399,8
Val24	2	3	0,6	6341,9
Val25	2	4	0,8	8270,9
Val26	2	4	0,8	8235,2
Val27	2	4	0,8	8238,4
Val28	2	5	1	9814,1
Val29	2	5	1	9821,6
Val30	2	5	1	9935,1
Val31	3	1	0,2	2300,4
Val32	3	1	0,2	2237,5
Val33	3	1	0,2	2261,9
Val34	3	2	0,4	4359,5
Val35	3	2	0,4	4254,5

Standards de validation (suite)

ID. Ech	Série	Niveau	Quantité en μg	Aire sous la courbe
Val36	3	2	0,4	4319,9
Val37	3	3	0,6	6245,8
Val38	3	3	0,6	6316,8
Val39	3	3	0,6	6215,1
Val40	3	4	0,8	8302,6
Val41	3	4	0,8	8184,1
Val42	3	4	0,8	8295,1
Val43	3	5	1	9926,3
Val44	3	5	1	9734,6
Val45	3	5	1	9838,4

ANNEXE 2 -Standards de calibration

ID. Ech	Série	Niveau	Quantité en µg	Aire sous la courbe
Cal01	1	1	0,2	2270,9
Cal02	1	1	0,2	2186,4
Cal03	1	1	0,2	2269,4
Cal04	1	2	0,4	4396,1
Cal05	1	2	0,4	4287,4
Cal06	1	2	0,4	4244,2
Cal07	1	3	0,6	6309,9
Cal08	1	3	0,6	6403,9
Cal09	1	3	0,6	6197,6
Cal10	1	4	0,8	8025,1
Cal11	1	4	0,8	8016,2
Cal12	1	4	0,8	7948,3
Cal13	1	5	1	9960,9
Cal14	1	5	1	9823,3
Cal15	1	5	1	9853,4
Cal16	2	1	0,2	2282,8
Cal17	2	1	0,2	2435,7
Cal18	2	1	0,2	2197,1
Cal19	2	2	0,4	4374,6
Cal20	2	2	0,4	4351,6
Cal21	2	2	0,4	4305,9
Cal22	2	3	0,6	6277,4
Cal23	2	3	0,6	6223,4
Cal24	2	3	0,6	6299,3
Cal25	2	4	0,8	8236,3
Cal26	2	4	0,8	8394,6
Cal27	2	4	0,8	8381,1
Cal28	2	5	1	9813,8
Cal29	2	5	1	9904,1
Cal30	2	5	1	9551,5
Cal31	3	1	0,2	2382,3
Cal32	3	1	0,2	2329,9
Cal33	3	1	0,2	2152,7
Cal34	3	2	0,4	4221,1
Cal35	3	2	0,4	4378,3

Standards de calibration (suite)

ID. Ech	Série	Niveau	Quantité en µg	Aire sous la courbe
Cal36	3	2	0,4	4140,7
Cal37	3	3	0,6	6266,4
Cal38	3	3	0,6	6302,3
Cal39	3	3	0,6	6320,1
Cal40	3	4	0,8	8109,9
Cal41	3	4	0,8	8182,9
Cal42	3	4	0,8	8297,1
Cal43	3	5	1	9824,8
Cal44	3	5	1	9997,9
Cal45	3	5	1	9875,4

ANNEXE 3 -Tableaux récapitulatifs des résultats de validation obtenus selon la nouvelle approche SFSTP 2003 (profil d'exactitude)

Tableau I - Résumé des résultats de validation obtenus en considérant le modèle de régression linéaire.

Probabilité tolérance (β)	95%				
Limite d'acceptabilité (λ)	5%				
Niveaux	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 5
Conc moyenne théorique (μ /zone)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Conc moyenne retrouvée (μ /zone)	0,1890	0,4062	0,6132	0,8169	0,9849
Fidélité					
Écart-type de répétabilité (s_r)	0,0024	0,0037	0,0055	0,0043	0,0072
Écart-type inter-séries (s_g)	0,0025	0,0000	0,0037	0,0000	0,0000
Écart-type de fidélité (s_{FI})	0,0035	0,0037	0,0066	0,0043	0,0072
Coefficient de variation de répétabilité	1,2071	0,9198	0,9166	0,5377	0,7161
Coefficient de variation de FI	1,7409	0,9198	1,1054	0,5377	0,7161
Rapport des variances (R)	1,0800	0,0000	0,4542	0,0000	0,0000
Justesse					
Biais relative (%)	-5,5091	1,5449	2,2038	2,1128	-1,5055
Biais absolu	-0,0110	0,0062	0,0132	0,0169	-0,0151
Intervalle de tolérance (IT)					
Nombre de degrés liberté	4,0327	7,7143	5,5045	7,7143	7,7143
Facteur de couverture (kIT)	2,7697	2,3228	2,5082	2,3228	2,3228
Écart-type de tolérance (sIT)	0,0039	0,0039	0,0072	0,0045	0,0075
Limite IT basse	0,1783	0,3972	0,5951	0,8064	0,9674
Limite IT haute	0,1997	0,4152	0,6313	0,8274	1,0025
Limite IT basse %	-10,8491	-0,7072	-0,8086	0,7961	-3,2588
Limite IT haute %	-0,1691	3,7969	5,2161	3,4294	0,2477
Limite d'acceptabilité basse	5	5	5	5	5
Limite d'acceptabilité haute	-5	-5	-5	-5	-5
Profil d'exactitude					
Recouvrement %	94,4909	101,5449	102,2038	102,1128	98,4945
Limite IT basse en %	89,1509	99,2928	99,1914	100,7961	96,7412
Limite IT haute en %	99,8309	103,7969	105,2161	103,4294	100,2477
Probabilité tolérance basse en %	95	95	95	95	95
Probabilité tolérance haute en %	105	105	105	105	105

Tableau II - Résumé des résultats de validation obtenus en considérant le modèle de régression quadratique.

Probabilité tolérance (β)	95%				
Limite d'acceptabilité (λ)	5%				
Niveaux	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 5
Conc moyenne théorique ($\mu\text{g}/\text{zone}$)	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Conc moyenne retrouvée ($\mu\text{g}/\text{zone}$)	0,2010	0,4001	0,6011	0,8115	0,9969
Fidélité					
Écart-type de répétabilité (s_r)	0,0022	0,0035	0,0055	0,0046	0,0082
Écart-type inter-séries (s_a)	0,0000	0,0020	0,0017	0,0000	0,0057
Écart-type de fidélité (s_{FI})	0,0022	0,0041	0,0057	0,0046	0,0099
Coefficient de variation de répétabilité	1,0952	0,8742	0,9171	0,5689	0,8155
Coefficient de variation de FI	1,0952	1,0125	0,9574	0,5689	0,9926
Rapport des variances (R)	0,0000	0,3414	0,0899	0,0000	0,4813
Justesse					
Biais relative (%)	0,4960	0,0315	0,1794	1,4402	-0,3111
Biais absolu	0,0010	0,0001	0,0011	0,0115	-0,0031
Intervalle de tolérance (IT)					
Nombre de degrés liberté	7,7143	5,9641	7,2591	7,7143	5,4059
Facteur de couverture (k _{IT})	2,3228	2,4514	2,3494	2,3228	2,5204
Écart-type de tolérance (s _{IT})	0,0039	0,0023	0,0044	0,0061	0,0048
Limite IT basse	0,1783	0,1956	0,3894	0,5867	0,8004
Limite IT haute	0,1997	0,2064	0,4109	0,6154	0,8227
Limite IT basse %	-10,8491	-2,1855	-2,6505	-2,2112	0,0474
Limite IT haute %	-0,1691	3,1775	2,7135	2,5701	2,8330
Limite d'acceptabilité basse	5	5	5	5	5
Limite d'acceptabilité haute	-5	-5	-5	-5	-5
Profil d'exactitude					
Recouvrement %	100,4960	100,0315	100,1794	101,4402	99,6889
Limite IT basse en %	89,1509	97,8145	97,3495	97,7888	100,0474
Limite IT haute en %	99,8309	103,1775	102,7135	102,5701	102,8330
Probabilité tolérance basse en %	95	95	95	95	95
Probabilité tolérance haute en %	105	105	105	105	105

ANNEXE 4 - Profil d'exactitude (modèle linéaire).

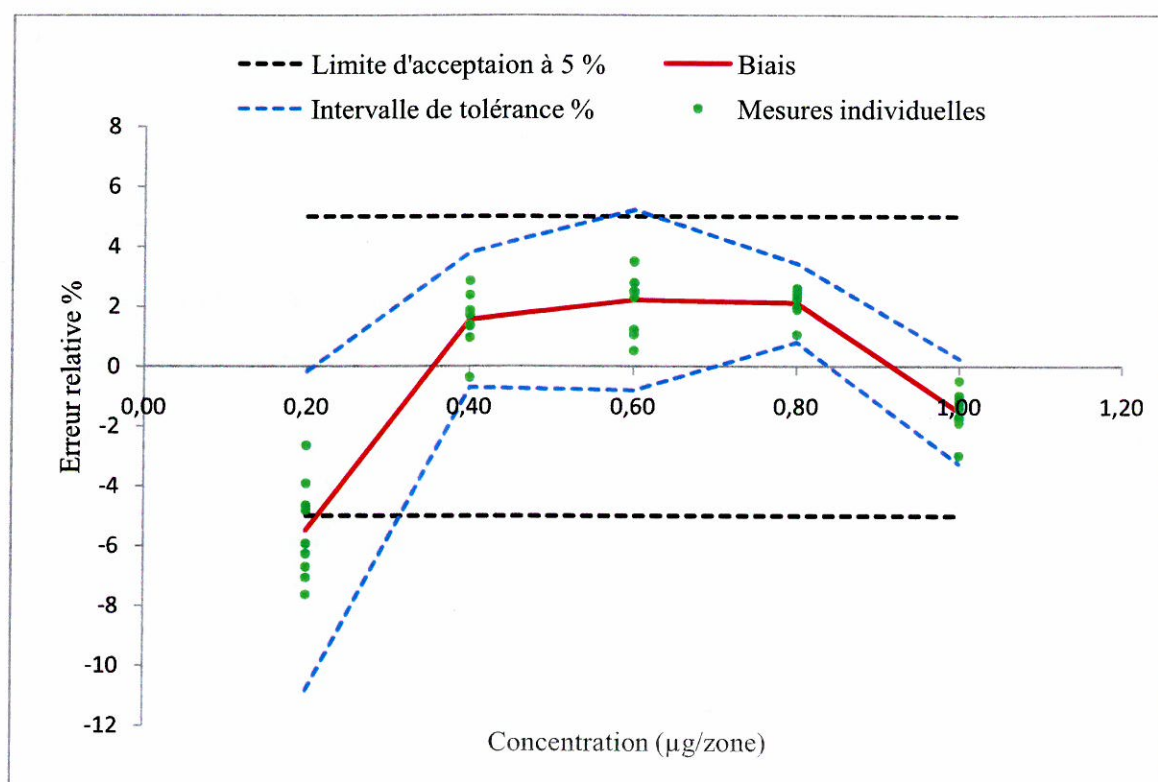


Figure 1 . Profil d'exactitude obtenu avec un risque de ± 5 , en considérant le modèle de régression linéaire établi avec 5 niveaux de concentration.

**ANNEXE 5 –Exemples de résultats d’analyse tels que présentés par le logiciel
« wincats »**

Track	Vial	Rf	Amount Fraction	Height	X(calc)	Area	X(calc)	Remark
1	A1	0.55	200.00 ng	90.29		2282.81		Std Level 1
2	A1	0.54	200.00 ng	90.95		2453.76		Std Level 1
3	A1	0.54	200.00 ng	91.05		2197.13		Std Level 1
4	A1	0.54	400.00 ng	143.99		4374.65		Std Level 2
5	A1	0.53	400.00 ng	151.81		4351.64		Std Level 2
6	A1	0.53	400.00 ng	149.13		4305.94		Std Level 2
7	A1	0.53	600.00 ng	199.18		6277.42		Std Level 3
8	A1	0.53	600.00 ng	196.10		6223.40		Std Level 3
9	A1	0.53	600.00 ng	199.64		6299.38		Std Level 3
10	A1	0.53	800.00 ng	226.51		8236.38		Std Level 4
11	A1	0.53	800.00 ng	230.76		8394.60		Std Level 4
12	A1	0.53	800.00 ng	223.16		8381.10		Std Level 4
13	A1	0.53	1000.00 ng	247.29		9813.82		Std Level 5
14	A1	0.53	1000.00 ng	249.02		9904.14		Std Level 5
15	A1	0.53	1000.00 ng	269.82		9551.53		Std Level 5

Figure 1. Résultats d’analyse - Standart de calibration , série 2 (deuxième jour) .

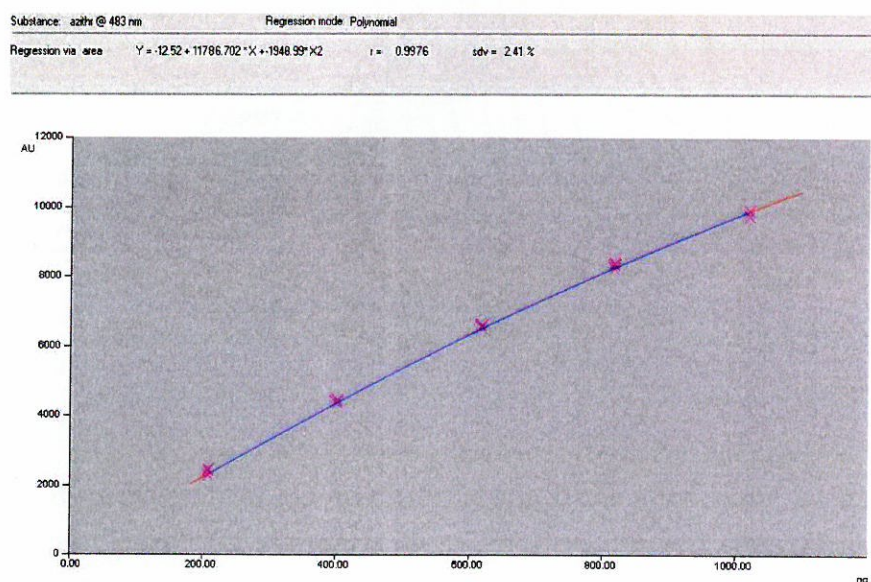


Figure 2. Droite d’étalonnage construite par le modèle quadratique passant par 5 niveaux de concentration - Standart de calibration , série 2 (deuxième jour)

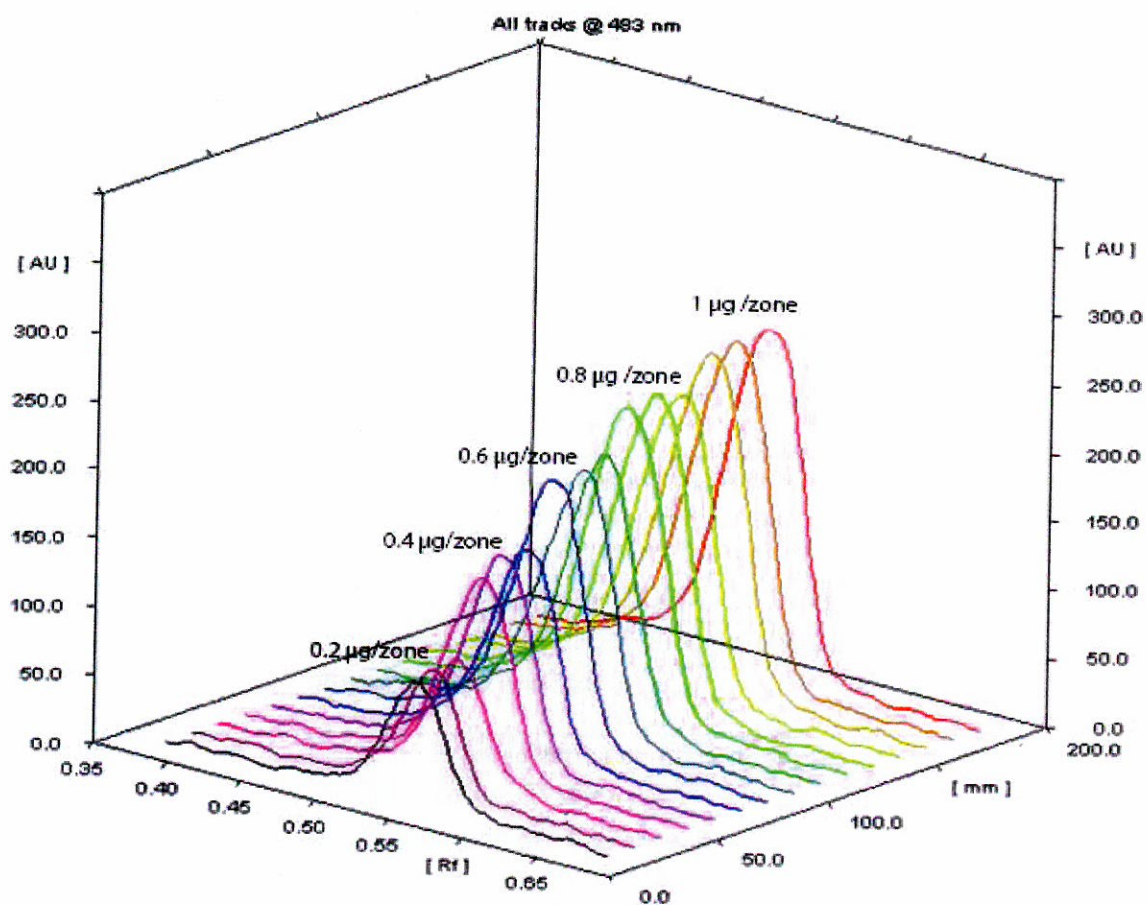


Figure 3. Représentation 3D du chromatogramme spécifique à l'azithromycine obtenu à partir des standards de calibration- série 2 (deuxième jour).

ANNEXE 6 - Tableau résumant les résultats de validation des quelques méthodes utilisées pour le dosage de l'azithromycine dans les produits pharmaceutiques.

<i>Méthode d'analyse</i>	<i>Résultats de validation</i>
HPLC avec détection UV (81)	La méthode est sélective et linéaire avec $r = 0,998$. Le pourcentage de recouvrement varie entre 98,7 à 100,0%, avec une valeur moyenne de 99,4% et un CV égal à 0,53%. $CV_r = 1,49\%$ et $CV_{FI} = 1.86\%$.
HPLC avec détection électro- chimique (84)	La méthode est sélective et linéaire avec $r = 0,999$. Analyse intrajour : le % recouvrement moyen varie entre 96,56 et 101,04 % et le CV varie entre 1,1 et 2,1 % Analyse interjour : le % recouvrement moyen varie entre 95,94 et 99,40% et le CV varie entre 3,4 et 5,3 %. LOD = 500 ng /ml et LOQ = 750 ng /ml.
Spectrofluorimétrie (112)	La méthode est spécifique et linéarité sur tout l'intervalle de 47.7 à 477 ng /ml avec $r = 0,9952$. Le pourcentage de recouvrement varie entre 98,3 à 100.8%. $CV_r = 0.88 \%$. LOD = 11.62 ng /ml et LOQ = 38.74 ng /ml.
Spectrophotométrie (113)	La méthode est spécifique avec un pourcentage de recouvrement moyen de $99,79 \pm 0,65\%$.
Voltamétrie (117)	La méthode est sélective et linéarité sur tout l'intervalle de 1 à 15 $\mu\text{g} / \text{ml}$ avec $r = 0,9982$. Le CV intra-jour est 0,87%. Le CV inter-jour est de 1,75% ($C=1,32 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) ; 2,28 % ($C=6.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) et 4,71% ($C=1,32 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) . LOD = 0,7 $\mu\text{g} / \text{ml}$.
Ampérométrie (121)	La méthode est sélective et linéarité sur tout l'intervalle de 1,0 à 10,0 mg / ml avec $r = 0,9987$. Le CV intra-jour est de 2,4 % (pour $C=1,4 \text{ mg} / \text{ml}$) et 1,6 % (pour $C=5,3 \text{ mg} / \text{ml}$) . Le CV inter-jour est 3.8 % et LOD = 0,76 mg / ml.

REFERENCES

1. Sherma J. Modern thin layer chromatography. *J, AOAC Inter* (2008) 91; 1142-1144.
2. Song Z., Wang C. Ultrasensitive Assay of Azithromycin in Medicine and Bio-Fluids Based on Its Enhanced Luminol-H₂O₂ Chemiluminescence Reaction Using Flow Injection Technique. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2003) 11 ; 5375-5380
3. A.Zlatkis. R.E kaiser (eds). HPTLC : High-performance Thin-Layer Chromatography. Elsevier, Amsterdam (1977)
4. Srivastava MM ,Variyar P.S., Chatterjee S., Sharma. A High-Performance Thin-Layer Chromatography . 1st edition (2011); 26-39
5. Sherma J and Fried B. Handbook of Thin Layer Chromatography, New York (2003).
6. Fried B and Sherma J. Thin Layer Chromatography, 4th Edition, New York (1999).
7. Miller JM. Chromatography-Concepts and Contrasts, 2nd Edition, New Jersey (2005).
8. Renger B. Quantitative planar chromatography as a tool in pharmaceutical analysis. *JAOAC Int*, (1993) 76; 7-13.
9. Renger B. Contemporary thin layer chromatography in pharmaceutical analysis. *JAOAC Int*, (1998) 81 ; 333-339.
10. Patel RB, Patel MR, Shankar MB ,Bhatt KK. Simultaneous estimation of acetylsalicylic acid and clopidogrel bisulfate in pure powder and tablet formulations by high-performance column liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography. *JAOAC Int*, (2008) 91; 750-755.

11. Patel RB, Patel MR. An introduction to analytical method development for pharmaceutical formulations. *Pharma Rev*, (2008) 6 ;4.
12. Patel RB, Patel AB, Patel MR, Shankar MB, Bhatt KK. Estimation of alprazolam and sertraline in pure powder and tablet formulations by high-performance liquid chromatography and highperformance thin-layer chromatography methods. *Anal Let* , (2009) 42, 1588–1602.
13. Patel MR, Patel RB, Parikh JR and Patel BG. HPTLC method for estimation of tazarotene in topical gel formulations and in vitro study. *Anal Methods*, (2010) 2, 275–281.
14. Srivastava MM ,Variyar P.S., Chatterjee S., Sharma. A High-Performance Thin-Layer Chromatography . 1st edition (2011); 41-49
15. Sherma J and Fried . B Handbook of Thin Layer Chromatography, 2nd edition, New York (1996).
16. Sethi PD. High performance thin layer chromatography, quantitative analysis of pharmaceutical formulations, New Delhi (1996).
17. Leslie S Ettre, Kalasz H. The Story of Thin-Layer Chromatography. LC-GC North America (2001) 19; 712-721
18. Elke H. Applied Thin-layer Chromatography . Best Pratie and avoidnace of mistakes, 2ème édition (2007).
19. GEISS F. The role of the vapor phase in Planar Chromatography. *J. Planar Chromatogr.*, (1988) 1; 102-115
20. Shewiyo D.H., Kaale E., Ugullum C., Sigonda M.N., Risha P.G., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y., Development and validation of a normal-phase HPTLC method for the simultaneous analysis of Lamivudine, Stavudine and Nevirapine in fixed dose combination tablets, *J. Pharm. Biomed.*

Anal. (2011) 54; 445–450.

21. Antic D., Filipic S., Agbaba D., A simple and sensitive TLC method for determination of Clopidogrel and its impurity SR 26334 in pharmaceutical products, *Acta Chromatogr.* (2007) 18; 199–206.

22. Vikas R.J.R., Sathiyarayan L., Yadav S.S., Stability indicating HPTLC method for Trandolapril estimation in the bulk drug and dosage form, *Indian J. Educ. Res.* (2010) 44; 341–344.

23. Bari S.B., Bakhshi A.R., Jain P.S., Surana S.J., Development and validation of stability – indicating TLC – densitometric determination of Ropinirole hydrochloride in bulk and pharmaceutical dosage form, *Pharm. Anal. Acta* (2011) 2; 2–7.

24. Rathore A.S., Sathiyarayanan L., Mahadik K.R., Development of validated HPLC and HPTLC methods for simultaneous determination of levocetirizine dihydrochloride and montelukast sodium in bulk and pharmaceutical dosage form, *Pharm. Anal. Acta – Open Access J.* 1 (2010); 1-6.

25. Shirkhedkar A.A., Bugdane P.M., Surana S.J., Stability – indicating TLC – densitometric determination of nebivolol hydrochloride in bulk and pharmaceutical dosage form, *J. Chromatogr. Sci.* (2010) 48 ; 102–113.

26. Shirkhedkar A.A., Shaikh A.M., Surana S.J., Simultaneous determination of paracetamol and piroxicam in tablets by thin-layer chromatography combined with densitometry, *Eurasian J. Anal. Chem.* (2008) 3; 258–267.

27. Borhade V.B., Nair H.A., Hegde D.D., Development and validation of HPTLC method for estimation of tacrolimus in formulations, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2009) 35; 440–448.

28. Chakraborty R., Pal K., Shaiba M., Sangepu N., Sridevi P., High performance thin-layer chromatographic estimation of ranolazine, *Res. J. Pharm.*

Biol. Chem. Sci. (2010) 4; 152–157.

29. Chitlange S.S., Kumar N., Wankhede S.B., Stability – indicating HPTLC method for estimation of dexibuprofen in pharmaceutical dosage form, *J. Pharm. Res.* (2009) 9 ;1542–1546.

30. Chopra S., Ahmad F.J., Khar R.K., Motwani S.K., Mahdi S., Iqbal Z., Talegaonkar S., Validated high performance thin-layer chromatography method for determination of trigonelline in herbal extract and pharmaceutical dosage form, *Anal. Chim. Acta* , (2006); 57746–51.

31. Cimpoiu C., Hosu A., Hodisan S., Analysis of some steroids by thin-layer chromatography using optimum mobile phases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2006) 41; 633–637.

32. Deshpande P., Gandhi S., Bhavnani V., Bandewar R., Dhiware A., Diwale V., High performance thin-layer chromatographic determination of famotidine and domperidone in combined tablet dosage form, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* (2010) 4; 354–359.

33. Devala Rao G., Kathirvel S., Satyanarayana S.V., Development and validation of TLC-Densitometry method for the estimation of Anti-psychotic drug in bulk and tablet formulation, *Int. J. ChemTech Res.* (2010) 2; 2063–2069.

34. Dhaneshwar S.S., Deshpande P., Patil M., Vadnekar G., Dhaneshwar S.R., Development and validation of a HPTLC method for estimation of duloxetine hydrochloride in bulk drug and in tablet dosage form, *Indian J. Pharm. Sci.* (2008) 70; 233–236.

35. Shah C.R., Suhagia B.N., Shah N.J., Shah R.R., Development and validation of a HPTLC method for the estimation of sumatriptan in tablet dosage forms, *Indian J. Pharm. Sci.* (2008) 70; 831–834.

36. Parmar P., Mehta A., Development and validation of HPTLC method for the

estimation of Clotrimazole in bulk drug and tablet formulations, *Indian J. Pharm. Sci.* (2009) 71 ; 451–454.

37. Joshi M., Nikalje A.P., Shahed M., Dehghan M., HPTLC method for the simultaneous estimation of emtricitabine and tenovofiv in tablet dosage forms, *Indian J. Pharm. Sci.* (2009) 71; 95–97.

38. Suganth A., John S., Ravi T.K., Simultaneous HPTLC determination of rabeprazole and itopride hydrochloride from their combined dosage form, *Indian J. Pharm. Sci.* (2008) 70; 366–368.

39. Habte G., Hymete A., Mohammed A.M.I., Simultaneous separation and determination of lamivudine and zidovudine in pharmaceutical formulations using the HPTLC method, *Anal. Lett.* (2009) 42;1552–1570.

40. Shewiyo D.H., Kaale E., Risha P.G., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y., Development and validation of a normal-phase high-performance thin layer chromatographic method for the analysis of Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Co-trimoxazole tablets, *J. Chromatogr. A* (2009) 1216 ;7102–7107.

41. Ali J., Ali N., Sultana Y., Baboota S., Faiyaz S., Development and validation of a stability indicating HPTLC method for analysis of antitubercular drugs, *Acta Chromatogr.* (2007) 13; 168–179.

42. Potale L.V., Khodke A.S., Patole S.M., Damle M.C., Development and validation of stability – indicating HPTLC method for determination of efavirenz as bulk drug and in pharmaceutical formulation, *J. Adv. Pharm. Res.* (2010) 1; 115–122.

43. Mahadik M.V., Dhaneshwar S.R., Application of stability – indicating HPTLC method for the quantitative determination of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms, *Asian J. Pharm. Sci.* (2007) 5; 182–190.

44. Agarwala S.P., Ali, A., Dua Y., Ahuja S., Determination of Artemisinin in bulk and pharmaceutical dosage forms using HPTLC, *Indian J. Pharm. Sci.* (2009) 71; 98–100.
45. Patel B.H., Suhagia B.N., Patel M.M., Patel J.R., HPTLC determination of rabeprazole and domperidone in capsules and its validation, *J. Chromatogr. Sci.* (2008) 46; 304–307.
46. Patel R.B., Patel M.R., Bhatt K.K., Patel B.G., Development and validation of a HPTLC method for estimation of Carbamazepine in formulations and its in vitro release study, *Chromatogr. Res. Int.* (2011) 2011; 1–8.
47. Patel V.A., Patel P.G., Chaudhary B.G., Rajgor N.B., Rathi S.G., Development and validation of HPTLC method for the simultaneous estimation of telmisartan and ramipril in combined dosage form, *Int. J. Pharm. Biol. Res.* (2010) 1; 18–24.
48. Dhaneshwar S.S., Daneshwar S.R., Deshpande P., Patil M., Development and validation of a method for the densitometric estimation of atorvastatin calcium and ezetimibe as the bulk drugs and tablet dosage forms, *Acta Chromatogr.* (2007) 19; 141–148.
49. Ranjane P.N., Gandhi S.V., Kadur S.S., Bothara K.G., HPTLC determination of cefuroxime axetil and ornidazole in combined tablet dosage forms, *J. Chromatogr. Sci.* (2010) 48; 26–28
50. Dhaneshwar S.R., Bhusari V.K., Mahadik M.V., Santakumari B., Application of a stability-indicating thin-layer chromatographic method to the determination of tenatoprazole in pharmaceutical dosage forms, *JAOAC Int.* (2009) 92; 387–393.
51. Meshram D.B., Bagade S.B., Tajne M.R., A simple TLC method for analysis of fluconazole in pharmaceutical dosage forms, *J. Planar Chromatogr.* (2008)

21; 191–195.

52. Anand M., Fonseca A., Santosh V.G., Deshpande B.P., Development and validation of a high-performance thin-layer chromatographic method for estimation of bromodine tartrate as bulk drug and ophthalmic solutions, *Int. J. ChemTech Res.* (2010) 2; 1376–1379.

53. Chandra P., Rathore A.S., Sathiyarayanan L., Mahalik K.R., Application of high-performance thin-layer chromatographic method for the simultaneous determination of Lamivudine and tenofovir disoproxil fumarate in pharmaceutical dosage form, *J. Chil. Chem. Soc.* (2011) 56; 702–705.

54. Shanmugasundaram P., Maheswari R., Vijayanandhi M., Quantitative estimation of piperine in herbal cough syrup by HPTLC method, *Rayasan J. Chem.* (2008) 1; 212–217.

55. Jain P.S., Stability – indicating HPTLC determination of ambroxol hydrochloride in bulk drug and pharmaceutical dosage form, *J. Chromatogr. Sci.* (2010) 48; 45–48.

56. Esters V., Angenot L., Brandt V., Frederich M., Tits M., Van Nerum C., Wauters J-N, Ph. Hubert, Validation of a high-performance thin-layer chromatography/ densitometry method for the quantitative determination of glucosamine in a herbal dietary supplement, *J. Chromatogr. A* (2006) 1112; 156–164.

57. Nyiredy S., in: E. Heftmann (Ed.), *Chromatography, Journal of Chromatography Library*, vol. 51A, 5th ed., Elsevier, Amsterdam, 1992, 109–150.

58. Kalasz H., Bathori M., Pharmaceutical applications of TLC, LC–GC Eur. 10 (2001) 311–321.

59. Shewiyo D.H., Kaale ERisha., P.G., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Vander HeydenY., HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: *A review of the method development and validation steps Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2012) 66; 11– 23
60. ISO 5725, Application of the Statistics-Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement-Parts 1 to 6, International Organisation for Standardization (ISO), Geneva (1994).
61. NORME NF ISO/CEI 17025 : Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais (2005).
62. International conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q 2 (R1) : Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, Geneva (2005).
63. Food and Drug Administration : International conference on Harmonization : guideline on validation of analytical procedures : definitions and terminology, *Fed.Regist.* (1995) 60; 11260-11262
64. Commission decision 2002/657/EC, OFF. J. Eur. Commu., L 221 (2002)
65. Shah V.P, Midha K.K., Dighe S., Mc Gilveray I., Skelly J.P., Ycobi A., Layloff T., Viswanathan C.C, Cook C. E., Mc Dowall R. D., Pittman K.A. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic studies. *J.Pharm.Sci.*(1992) 81 ; 309-312
66. Food and Drug Administration : International conference on Harmonization : guideline on validation of analytical procedures : methodology, *Fed. Regist.* (1997) 62 ; 27463-27467
67. Hubert Ph., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P.A., Dewe W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C., Valat L., *STP Pharma Pratiques* (2003) 13 ; 101.

68. Ph.Hubert, Nguyen-Huu J.J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P.A., Dewe W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C., Valat L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal-part I. *J. Pharm.Biomed.Anal.* (2004) 36; 579-586
69. Ph Hubert., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P.A., Dewe W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C., Valat L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal-part II. *J. Pharm.Biomed.Anal.* (2007) 45; 70-81
70. Ph Hubert., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P.A., Dewe W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C., Valat L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal-part III. *J. Pharm.Biomed.Anal.* (2007) 45; 82-96
71. Ph.Hubert, Nguyen-Huu J.J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P.A., Dewe W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C., Valat L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal-part IV. Examples of application. *J. Pharm.Biomed.Anal.* (2008) 48; 760-771
72. Bouzlouze A., Digua K. Démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique, les technologies de laboratoire, N°1(2006).
73. Caporal-Gauthier J., Nivet J.M., Algranti P., Guilloteau M., Histe M., Lallier M., N'Guyen-Huu J.J., Russotto R. Guide to analytical validation. Report of an SFSTP commission, *STP Pharma prat.* (1992) 2 ; 205-239
74. La réglementation des médicaments dans l'union européenne. Bonnes

Pratiques de Fabrication.Médicaments à usage humain et médicaments vétérinaires (1999).

75. Guideline on general principles of process validation .*Us Food and Drug Administration : Center of Drug Evaluation and Research* (1987).
76. ICH Q2B validation analytical procedures : Methodology
77. Peters F. T., Drummer O. H., Musshoff F., Validation of new methods. *Forensic Science International* (2007)165; 216-224.
78. Ph. Hubert et al . validation of quantitative analytical procedures. Harmonization of approaches, STP Pharma Pratiques. (2003) 13; 101-138
79. Mcguire J.M., Bunch R.L., Anderson R.C., Boaz H.E., Flynn E.H., Powell H., Smith J.E. Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiot Chemother.*, (1952) 2 ; 281-283
80. Van bambekel F., Verhaegene J., Tytecal D., Auckenthalere R. et Tulkensi P.M. érythromycine et néomacrolides actuels, usages cliniques et perspectives. *Louvain Med.*, (2000) 119 ; 259-286
81. Bright G.M., Nagel A.A., Bordner J., Desa K.A., Dibrino J.N., Nowakowska J., Sciavolino F.C. Synthesis, in vitro and in vivo activity of novel 9-deoxo-9a-AZA-9a-homoerythromycin A derivatives: a new class of macrolide antibiotics, the azalides. *J Antibiot.*, (1988) 41;1029-1047.
82. Djokic S., Kobrehel G., Lopotar N., Kamenar B., Nagl A., Mrvos D. – Erythromycin series. Part 13. Synthesis and structure elucidation of 10-dihydro-10- deoxo-11-methyl-11-azerythromycin A. *J Chem Res(M)*, (1988); 1239-1261
83. Carlier M.B., garcia-luque I., Montenez J.-P., Tulkens P.M., Piret J. Accumulation, release and subcellular localization of azithromycin in phagocytic cells in culture. *Int J Tissue React.* (1994) 16 ;211-220.

84. Gladue R.P., Snider M.E. Intracellular accumulation of azithromycin by cultured human fibroblasts. *Antimicrob Agents Chemother.*, (1990) 34; 1056-1060
85. Foulds G., Shepard R.M., Johnson R.B. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *J Antimicrob Chemother (A)*, (1990) 25; 73-82
86. Wildfeuer A., Laufen H., Zimmermann T. Distribution of orally administered azithromycin in various blood compartments. *Int J Clin Pharmacol Ther.*, (1994) 32; 356-360
87. Lode H., Borner K., Koeppe P., Schaberg T. Azithromycin – review of key chemical, pharmacokinetic and microbiological features. *J Antimicrob Chemother.*, (1996) 37; 1-8
88. Meyer A.P., Bril-bazuin C., Mattie H., Van den broeck P.J. Uptake of azithromycin by human monocytes and enhanced intracellular activity against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, (1993) 37; 2318-2322
89. Segreti J., Meyer P., Kapell K. In vitro activity of macrolides against intracellular *Legionella pneumophila*. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, (1996) 25; 120-126
90. Zi Yi Y., Lin W., Xing T. Determination of azithromycin by ion-pair HPLC with UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2009) 49 ; 811-815
91. Kamau F.N., Chepkwony H.K., Ngugi J.K., Debremaeker D., Roets E., Hoogmartens J. Isocratic liquid chromatographic method for the analysis of azithromycin and its structurally related substances in bulk samples. *J Chromatogr. Sci* (2002) 40 ; 529-533
92. Zubata P, Ceresole R, Rosasco MA, Pizzorno MT. A new HPLC method for azithromycin quantitation. *J. Pharm. Biomed. Anal* (2002) 27 ; 833-836

93. Al-Rimawi. F, Kharaaf.M. Analysis of Azithromycin and Its Related Compounds by RP-HPLC with UV Detection. *J. Chromatogr.Sci* (2010) 48; 86-90
94. Ghari.T, Kobarfard. F, Mortazavi. S. Development of a simple RP-HPLC-UV method for determination of azithromycin in pharmaceutical dosage forms as an alternative to the USP method. *Research in Pharmaceutical Sciences*, (2012) 7; 624
95. Gandhi R., Kaul C.L., Panchagnula R. Validated HPLC Method for In Vitro Analysis of Azithromycin by Using Electrochemical Detection . *J Pharm Biomed Anal* (2000) 23 ;1073-1079
96. United States Pharmacopoeia: National Formulary, USP23:NF18, USP Convention Inc., Rockville, MD, 1995; 152–154
97. Pharmacopée Européenne, 7ème édition, 2011: 1649
98. Kashaba P.Y. Spectrofluorimetric analysis of certain macrolide antibiotics in bulk and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal* (2002) 27 ; 923-932
99. Kelani K., Lories L. B. Spectrophotometric determination of some n-donating drugs using DDQ. *Anal. Lett.* , (1997) 30 ;1843-1860
100. Paula C.E.R. de, Almeida V.G.K., Cassella R.J. Novel spectrophotometric method for the determination of azithromycin in pharmaceutical formulations based on its charge transfer reaction with quinalizarin. *J. Braz. Chem. Soc.*, (2010) 21 ; 1664-1671
101. Rachidi. M., Elharti J., Digua K., Cherrah Y., Bouklouze A.. New Polymeric Membrane Electrode for Azithromycin Determination . *Anal. Lett.*, (2007) 40 ; 53-66
112. Nigovic B., Simunic B. Voltammetric assay of azithromycin in

pharmaceutical dosage forms . *J Pharm Biomed Anal*; **(2003)** 32 ;197-202

113. Palomeque. E.M, Ortiz I.P. New automatized method with amperometric detection for the determination of azithromycin . *Talanta* **(2007)** 72 ;101–105

114. Anbazhagan S., Indumathy N., Shanmugapandigayan P., Sridhar S.K., Simultaneous quantification of Stavudine, Lamivudine and Nevirapine by UV spectroscopy, reversr phase HPLC and HPTLC in tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **(2005)** 39 ; 801–804.

115. Starek M., Krzek J., TLC chromatographic–densitometric assay of ibuprofen and its impurities, *J. Chromatogr. Sci.* **(2010)** 48 ; 825–829.

116. Puranik M, Bhawsar DV, Rathi P, Yeole PG. Simultaneous Determination of Ofloxacin and Ornidazole in Solid Dosage Form by RP-HPLC and HPTLC Techniques. *Indian J Pharm Sci* (**2010**) 72; 513-517.

117. Bhavar G, Chatpalliwar VA. Quantitative analysis of propranolol hydrochloride by high performance thin layer chromatography. *Indian J Pharm Sci.* **(2008)** 7; 395-398.

118. Patel RB, Patel MR, Bhatt KK, Patel BG. Development and validation of an HPTLC method for determination of olanzapine in formulations. *J AOAC Int* **(2010)** 93; 811-9

119. Jha P, Parveen R, Khan SA, Alam O, Ahmad S. Stability-indicating high-performance thin-layer chromatographic method for quantitative determination of omeprazole in capsule dosage form. *J AOAC Int* **(2010)** 93; 787-791.

120. Khatal LD, Kamble AY, Mahadik MV, Dhaneshwar SR. Validated HPTLC method for simultaneous quantitation of paracetamol, diclofenac potassium, and famotidine in tablet formulation. *J AOAC Int* **(2010)** 93; 765-770.

121. Rajmane VS, Gandhi SV, Patil UP, Sengar MR. High-performance thin-layer chromatographic determination of etoricoxib and thiocolchicoside in

combined tablet dosage form. *J AOAC Int* (2010) 93; 783-786.

122. V.P. Machale, A.T. Gatade, R.T. Sane, Validated HPTLC content uniformity test for the determination of diazepam in tablet dosage form, *Int. J. Pharm. Res. Dev.* (2011) 3; 34-41

123. Yadav D, Tiwari N, Gupta MM. Simultaneous quantification of diterpenoids in *Premna integrifolia* using a validated HPTLC method. *J Sep Sci* (2011) 34; 286-291.

124. Patel KG, Patel VG, Patel KV, Gandhi TR. Validated HPTLC Method for Quantitative Determination of Gallic Acid in Stem Bark of *Myrica esculenta* Buch.-Ham. Ex D. Don, Myricaceae. *J AOAC Int* (2010) 93; 1422-1427.

125. Pagi KB, Lahiri SK, Yadav GK, Shah MB. Development and Validation of HPTLC Method for Determination of Betulinic Acid in *Helicteres isora* root Extract. *Development* (2010) 2; 851-855.

126. Chakraborty GS. Quantitative estimation of ascorbic acid by HPTLC in different varieties of amla. *J Young Pharm*, (2009) 1; 82.

127. Jadhav VM, Kedar US, Gholve SB, Kadam VJ. Development and Validation of HPTLC Method for Determination of Glycyrrhizin in Herbal Extract and in Herbal Gel. *Development* (2009) 1; 826-831.

128. Hong T, Jeong ML, Zahn M, Fay BA, Lee K, Hwangbo H, et al. Detection of the Potential Adulterant *Teucrium chamaedrys* in *Scutellaria baicalensis* Raw Material and Extract by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J AOAC Int* (2009) 92; 785-788.

129. Patel RK, Kanani RJ, Patel VR, Patel MG. Development and Validation of HPTLC Method for Simultaneous Quantification of Vasicine and Piperine in *Vasavaleha*. *Int J* (2010) 2; 14-17.

130. Weber W. Luminographic detection of toxicity with *Vibrio fischeri*

(luminescent bacteria). CAMAG Bibliography Service (2005) 94.

131. Verbitski SM, Gourdin GT, Ikenouye LM, McChesney JD. Rapid Screening of Complex Mixtures by Thin-Layer Chromatography-Bioluminescence. *Am Biotechnol Lab* (2006) 40; 2.

132. Dongre VG, Kamble VW. HPTLC detection and identification of heroin (diacetylmorphine) in forensic samples. Part III. *J Planar Chromatogr-Mod TLC* (2003) 16; 458-460.

133. Neumann C, Margot P. New perspectives in the use of ink evidence in forensic science: Part I. Development of a quality assurance process for forensic ink analysis by HPTLC. *Forensic Sci Int* (2009) 185; 29-37.

134. S. Mennickent, R. Fierro, M. Vega, M. De Diego, C.G. Godoy, Quantitative determination of fluoxetine in huma serum by high-performance thin-layer chromatography, *J. Sep. Sci.* (2010) 33; 2206-2210.

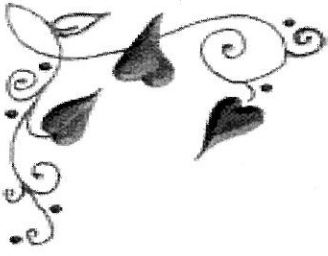
135. G.K. Jain, N. Jain, Z. Iqbal, S. Talegaonkar, F.J. Ahmad, R.K. Khar, Development and validation of an HPTLC method for the determination of minocycline in human plasma, *Acta Chromatogr.* (2007) 19; 197-205.

136. Le Roux AM, Wium CA, Joubert JR, Van Jaarsveld PP. Evaluation of a high-performance thin-layer chromatographic technique for the determination of salbutamol serum levels in clinical trials. *J Chromatogr* (1992) 581; 306-9.

137. Fuchs B, Schiller J, Süß R, Zscharnack M, Bader A, Müller P, et al. Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS, *Anal Bioanal Chem* (2008) 392; 849-860.

138. Bernardi T, Tamburini E. An HPTLC-AMD method for understanding the metabolic behavior of microorganisms in the presence of mixed carbon sources. The case of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239. *JPC-J Planar Chromatogr-Modern TLC* (2009) 22; 321-325.

139. E. Kaale, P. Risha, T. Layloff, An interlaboratory investigation on the use of high-performance thin layer chromatography to perform assay of Lamivudine-Zidovudine, Metronidazole, Nevirapine and Quinine composite samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (19) (2011) 2732–2736.
140. Sherma J., Fried B. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, 3rd edition (2003) ;553
141. Vanderhaeghe H., Kerremans L. Thin-layer chromatography of macrolide antibiotics. *J. Chromatogr.* (1980) 193 ; 119-127
142. Khedr A. , Sheha M. Quantitative thin-layer chromatographic method of analysis of azithromycin in pure and capsule forms. *J. Chromatogr. Sci.* (2003) 41; 10–16.
143. Kwiecień A., Krzek J., Biniek Ł. TLC-densitometric determination of azithromycin in pharmaceutical preparations . *J plan Chromatogr.* (2008) 21 ; 177–182.
144. Guideline STP Pharma Pratiques (1992) 4; 205-226
145. ICH Q2B validation analytical procedures : Methodology
146. Food and Drug Administration: International Conference on Harmonization: guideline on validation of analytical procedures: definitions and terminology, *Fed. Regist.*, (1995) 60; 11260 – 11262.
147. Van Loock J., Elskens M., Croux C., Beernaert H., Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient, *Accred. Qual. Assur.*, (2002) 7; 281 – 285.
148. Hibbert D.B., Further comments on the (miss-)use of r for testing the linearity of calibration functions, *Accred. Qual. Assur.* (2005) 10, 300-301.



جامعة محمد الخامس

كلية الطب والصيدلة

- الرباط -

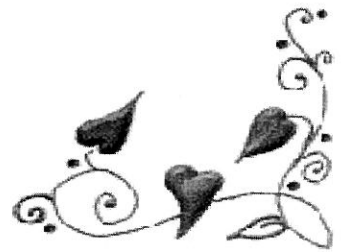
قسم الصيدلي

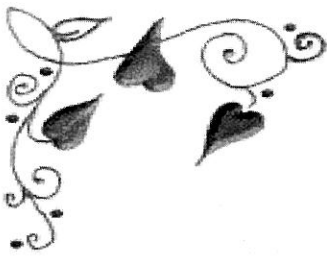
بسم الله الرحمن الرحيم

وأحسن بالله العتق

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبآداب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

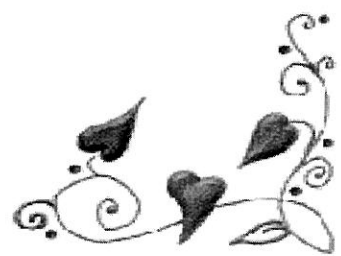




Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à législation en vigueur aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne pas dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



جامعة محمد الخامس -السويس-
كلية الطب والصيدلة بالرباط

سنة : 2012

أطروحة رقم : 75

تطوير طريقة جديدة للتحليل الكمي للأزيتروميسين بواسطة
الكروماتوجرافيا على طبقة رقيقة عالية الأداء (HPTLC) والتحقق
من صحتها وفقا للمبادئ التوجيهية SFSTP 2003
أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :
من طرف

السيدة : سارة الزراوي

المزودة في 23 شتنبر 1986 بالقنيطرة

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: HPTLC، تحليل الأدوية، أزيتروميسين، التحقق من صحة التحليل

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرف

أعضاء

{

السيد : يحيى الشراح
أستاذ في علم الصيدلة
السيد: عبد العزيز بوكروز
أستاذ في التطبيقات الصيدلانية
السيد: مصطفى الدراوي
أستاذ في الكيمياء التحليلية
السيد: مولاي عباس فوزي
أستاذ في علم الصيدلة