

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

ANNEE: 2017

THESE N°: 64

DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DES METHODES
DE DOSAGE ET DE RECHERCHE DES SUBSTANCES
APPARENTEES DE LA FLUCLOXACILLINE SODIQUE PAR HPLC

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mlle. Imane EL ASRI

Née le 21 Mars 1992 à Tamanar Essaouira

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Flucloxacillin sodique – Gélule – HPLC/DAD – Validation.

JURY

Mr. A. BOUKLOUZE

Professeur de Toxicologie

PRESIDENT

Mr. Y. CHERRAH

Professeur de Pharmacologie

RAPPORTEUR

Mr. M. DRAOUI

Professeur de Chimie Analytique

Mr. J. EL HARTI

Professeur de Chimie Thérapeutique

JUGES



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31



بِسْمِ اللَّهِ
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



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

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur 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
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. Mohamed KARRA

1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS

**ET
PHARMACIENS**

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – <u>Clinique Royale</u>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID Younes	Pathologie Chirurgicale
--------------------	-------------------------

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. CHAHED OUZZANI Houria	Gastro-Entérologie
Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
Pr. YAHYAOUI Mohamed	Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. CHAD Bouziane
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne – Doyen de la FMPR
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOU DA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation – Doyen de la FMPO
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – Dir. du Centre National PV
Chimie thérapeutique V.D à la pharmacie+Dir du CEDOC

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOU DA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques Doyen de la FMPA
Gynécologie Obstétrique



Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale- **Directeur CHIS**
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

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

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie - **Directeur HMI Med V**
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie



Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Pédiatrie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*

Gastro-Entérologie
Neurologie – *Doyen de la FMP Abulcassis*
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie
Cardiologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Traumatologie Orthopédie- *Dir. Hop. Av. Marr.*
Anesthésie-Réanimation *Inspecteur du SSM*
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne



Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie *Directeur Hop. Chekikh Zaied*
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Neurologie

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

ORL

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSE Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBABH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie **Directeur. Hop.d'Enfants**
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie



Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHA Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale

Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
Pr. EL HAOURI Mohamed *
Pr. FILALI ADIB Abdelhai
Pr. HAJJI Zakia
Pr. IKEN Ali
Pr. JAAFAR Abdeloihab*
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. LAGHMARI Mina
Pr. MABROUK Hfid*
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RACHID Khalid *
Pr. RAISS Mohamed
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
Pr. RHOU Hakima
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOUGHALEM Mohamed*
Pr. BOULAADAS Malik
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid

Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique
Oto-Rhino-Laryngologie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

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

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie



Pr. BARKAT Amina
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZAoui Sakina*
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najja

Pédiatrie
Cardiologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie (mise en disponibilité)
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Saïd*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saïda*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

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

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie



Pr. ACHOUR Abdessamad*
 Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
 Pr. AMHAJJI Larbi*
 Pr. AOUI Sarra
 Pr. BAITE Abdelouahed*
 Pr. BALOUCH Lhousaine*
 Pr. BENZIANE Hamid*
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHARKAOUI Naoual*
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
 Pr. ELABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GHARIB Noureddine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhousain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ez zohra*
 Pr. RABHI Monsef*
 Pr. RADOUANE Bouchaib*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine*
 Pr. SIFAT Hassan*
 Pr. TABERKANET Mustafa*
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour*
 Pr. TLIGUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
 Pr TAHIRI My El Hassan*

Chirurgie générale
 Chirurgie cardio vasculaire
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Anesthésie réanimation **Directeur ERSM**
 Biochimie-chimie
 Pharmacie clinique
 Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologique
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie



Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
Pr. AGDR Aomar*
Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
Pr. AKHADDAR Ali*
Pr. ALLALI Nazik
Pr. AMINE Bouchra
Pr. ARKHA Yassir
Pr. BELYAMANI Lahcen*
Pr. BJIJOU Younes
Pr. BOUHSAIN Sanae*
Pr. BOUI Mohammed*
Pr. BOUNAIM Ahmed*
Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
Pr. CHAKOUR Mohammed *
Pr. CHTATA Hassan Toufik*
Pr. DOGHMI Kamal*
Pr. EL MALKI Hadj Omar
Pr. EL OUENNASS Mostapha*
Pr. ENNIBI Khalid*
Pr. FATHI Khalid
Pr. HASSIKOU Hasna *
Pr. KABBAJ Nawal
Pr. KABIRI Meryem
Pr. KARBOUBI Lamya
Pr. L'KASSIMI Hachemi*
Pr. LAMSAOURI Jamal*
Pr. MARMADE Lahcen
Pr. MESKINI Toufik
Pr. MESSAOUDI Nezha *
Pr. MSSROURI Rahal
Pr. NASSAR Ittimade
Pr. OUKERRAJ Latifa
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. CHADLI Mariama*
Pr. CHEMSI Mohamed*
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*

Médecine interne
Pédiatre
Chirurgie Générale
Neurologie
Neuro-chirurgie
Radiologie
Rhumatologie
Neuro-chirurgie
Anesthésie Réanimation
Anatomie
Biochimie-chimie
Dermatologie
Chirurgie Générale
Traumatologie orthopédique
Hématologie biologique
Chirurgie vasculaire périphérique
Hématologie clinique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Médecine interne
Gynécologie obstétrique
Rhumatologie
Gastro-entérologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Microbiologie *Directeur Hôpital My Ismail*
Chimie Thérapeutique
Chirurgie Cardio-vasculaire
Pédiatrie
Hématologie biologique
Chirurgie Générale
Radiologie
Cardiologie
Pneumo-phtisiologie



Anesthésie réanimation
Médecine interne
Physiologie
ORL
Microbiologie
Médecine aéronautique
Biochimie chimie
Radiologie
Chirurgie pédiatrique
Pédiatrie
Radiologie

Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. LAMALMI Najat
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Chirurgie plastique et réparatrice
Urologie
Gastro entérologie
Anatomie pathologique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie générale
Hématologie
Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. BELAIZI Mohamed*
Pr. BENCHEBBA Driss*
Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. RAISSOUNI Maha*

Chirurgie Pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Psychiatrie
Traumatologie Orthopédique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie pathologique
Psychiatrie
Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir
Pr. AIT EL CADI Mina
Pr. AMRANI HANCHI Laila
Pr. AMOUR Mourad
Pr. AWAB Almahdi
Pr. BELAYACHI Jihane
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr. BENCHEKROUN Laila
Pr. BENKIRANE Souad
Pr. BENNANA Ahmed*
0.
Pr. BENSGHIR Mustapha*
Pr. BENYAHIA Mohammed*
Pr. BOUATIA Mustapha
Pr. BOUABID Ahmed Salim*
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
Pr. CHAIB Ali*
Pr. DENDANE Tarek
Pr. DINI Nouzha*
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
Pr. ELFATEMI Nizare
Pr. EL GUERROUJ Hasnae
Pr. EL HARTI Jaouad

Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique

Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique



Pr. EL JOUDI Rachid*
 Pr. EL KABABRI Maria
 Pr. EL KHANNOUSSI Basma
 Pr. EL KHLOUFI Samir
 Pr. EL KORAICHI Alae
 Pr. EN-NOUALI Hassane*
 Pr. ERRGUIG Laila
 Pr. FIKRI Meryim
 Pr. GHFIR Imade
 Pr. IMANE Zineb
 Pr. IRAQI Hind
 Pr. KABBAJ Hakima
 Pr. KADIRI Mohamed*
 Pr. LATIB Rachida
 Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr. MEDDAH Bouchra
 Pr. MELHAOUI Adyl
 Pr. MRABTI Hind
 Pr. NEJJARI Rachid
 Pr. OUBEJJA Houda
 Pr. OUKABLI Mohamed*
 Pr. RAHALI Younes
 Pr. RATBI Ilham
 Pr. RAHMANI Mounia
 Pr. REDA Karim*
 Pr. REGRAGUI Wafa
 Pr. RKAIN Hanan
 Pr. ROSTOM Samira
 Pr. ROUAS Lamiaa
 Pr. ROUIBAA Fedoua*
 Pr. SALIHOUN Mouna
 Pr. SAYAH Rochde
 Pr. SEDDIK Hassan*
 Pr. ZERHOUNI Hicham
 Pr. ZINE Ali*

Toxicologie
 Pédiatrie
 Anatomie Pathologie
 Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Physiologie
 Radiologie
 Médecine Nucléaire
 Pédiatrie
 Endocrinologie et maladies métaboliques
 Microbiologie
 Psychiatrie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*
 Pr. GHOUNDALE Omar*
 Pr. ZYANI Mohammad*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Urologie
 Médecine Interne

**Enseignants Militaires*



MARS 2014

ACHIR ABDELLAH
BENCHAKROUN MOHAMMED
BOUCHIKH MOHAMMED
EL KABBAJ DRISS
EL MACHTANI IDRISSE SAMIRA
HARDIZI HOUYAM
HASSANI AMALE
HERRAK LAILA
JANANE ABDELLA TIF
JEAIDI ANASS
KOUACH JAOUAD
LEMNOUER ABDELHAY
MAKRAM SANAA
OULAHYANE RACHID
RHISSASSI MOHAMED JMFAR
SABRY MOHAMED
SEKKACH YOUSSEF
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Urologie
Hématologie Biologique
Génécologie-Obstétrique
Microbiologie
Pharmacologie
Chirurgie Pédiatrique
CCV
Cardiologie
Médecine Interne
Génécologie-Obstétrique

***Enseignants Militaires**

DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'
AIT BOUGHIMA FADILA
BEKKALI HICHAM
BENAZZOU SALMA
BOUABDELLAH MOUNYA
BOUCHRIK MOURAD
DERRAJI SOUFIANE
DOBLALI TAOUFIK
EL AYOUBI EL IDRISSE ALI
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM
EL MARJANY MOHAMMED
FEJJAL NAWFAL
JAHIDI MOHAMED
LAKHAL ZOUHAIR
OUDGHIRI NEZHA
Rami Mohamed
SABIR MARIA
SBAI IDRISSE KARIM

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

***Enseignants Militaires**



AOUT 2015

Meziane meryem
Tahri latifa

Dermatologie
Rhumatologie

JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE
EL ASRI FOUAD
ERRAMI NOUREDDINE
NITASSI SOPHIA

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

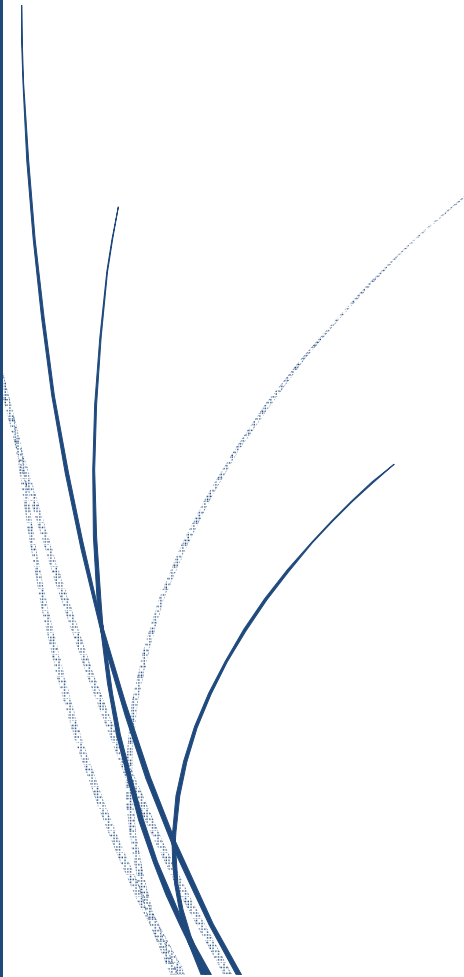
Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootecnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

*Mise à jour le 14/12/2016 par le
Service des Ressources Humaines*





DEDICACES



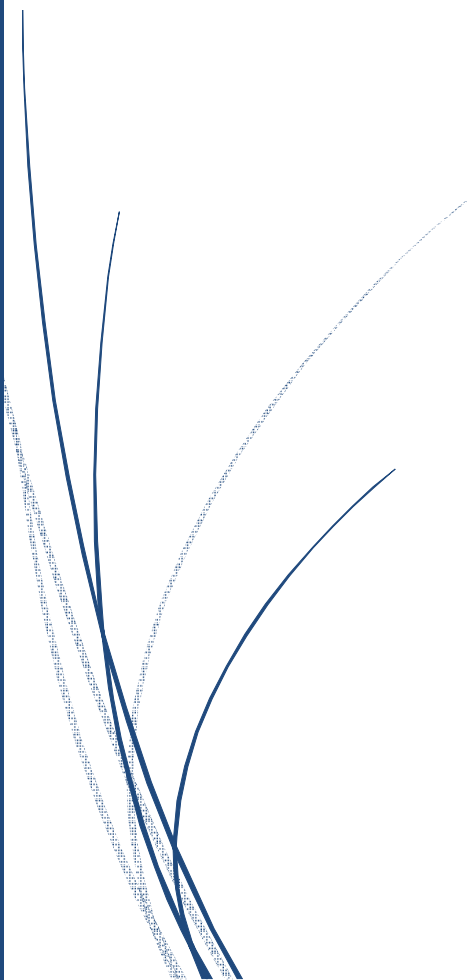
A la mémoire de mon Père

A ma Mère

A ma Sœur et mes Frères



Remerciements



A Notre Maître et Président de thèse
Monsieur le Professeur A. BOUKLOUZE
Professeur de Toxicologie

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant la présidence de notre jury de thèse.

Votre culture scientifique, votre compétence et vos qualités humaines ont suscité en nous une grande admiration, et sont pour vos élèves un exemple à suivre.

Veillez accepter, cher Maître, l'assurance de notre estime et notre profond respect.

A Notre Maître et Rapporteur de thèse

Monsieur le Professeur Y. CHERRAH

Professeur de Pharmacologie

Nous vous remercions pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu encadrer ce travail.

Nous avons eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et avons trouvé auprès de vous le conseil et le guide.

Votre compétence, votre dynamisme, votre rigueur et vos qualités humaines et professionnelles ont suscité en nous une grande admiration et un profond respect.

Veillez accepter, cher Maître, l'assurance de notre estime et de notre profond respect.

A Notre Maître et juge de thèse

Monsieur le Professeur M. DRAOUI

Professeur de Chimie analytique

C'est pour nous un grand honneur que vous acceptiez de siéger parmi cet honorable jury.

Nous admirons vos qualités humaines et professionnelles ainsi que votre modestie qui reste exemplaire.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre reconnaissance et notre grande estime.

A notre Maître et juge de thèse

Monsieur le Professeur J. ELHARTI

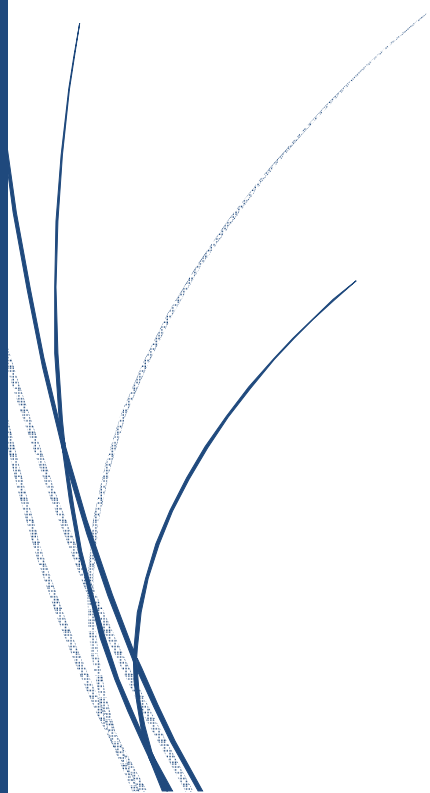
Professeur de Chimie thérapeutique

Vous avez accepté avec grande amabilité de juger cette thèse.

Cet honneur nous touche infiniment et nous tenons à vous exprimer nos sincères remerciements et notre profond respect.



LISTE DES ILLUSTRATIONS



LISTE DES ABREVIATIONS

%	: Pourcentage
°C	: Degré Celsius
AMM	: Autorisation de mise sur le marché
CL	: Chromatographie liquide
CV	: Coefficient de variation
DAD	: Diode array detector
Ddl	: degré de liberté
FP	: Forme pharmaceutique
MP	: Matière première
HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance
ICH	: International Conference On Harmonisation
LD	: Limite de détection
LQ	: Limite de quantification
M	: Molarité
m/v	: Masse/ volume
N	: Normalité
Ph. Eur	: Pharmacopée européenne
Rs	: Résolution
SFSTP	: Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
Tr	: Temps de rétention
w/w	: Weight/weight

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Structure chimique de la Flucloxacilline sodique	4
Figure 2 - Structure chimique de l'impureté A (R = CO ₂ H), et de l'impureté B (R = H)	4
Figure 3- Structure chimique de l'impureté C	5
Figure 4- Structure chimique de l'impureté D	5
Figure 5- Structure chimique de l'impureté E	5
Figure 6- Composants d'une chaîne HPLC	8
Figure 7- Courbe de régression linéaire du dosage de Flucloxacilline dans la MP	37
Figure 8- Courbe de régression linéaire du dosage de Flucloxacilline dans la FP	37
Figure 9- Répartition aléatoire des résidus dans la MP- Dosage	39
Figure 10- Répartitions aléatoire des résidus dans la FP – Dosage	39
Figure 11- Courbe de régression linéaire de dissolution de Flucloxacilline - FP	40
Figure 12- Répartition aléatoire des résidus dans la FP - Dissolution	41
Figure 13- Chromatogramme du blanc - dosage	50
Figure 14- Chromatogramme du placebo 1	51
Figure 15- Chromatogramme du témoin de Flucloxacilline	51
Figure 16- Chromatogramme de l'essai reconstitué de la FP	51
Figure 17- Pureté du pic du témoin de Flucloxacilline	52
Figure 18- Pureté du pic de l'essai reconstitué de la FP	52
Figure 19- Courbe de régression linéaire du standard de Flucloxacilline à 1% - MP	55
Figure 20- Courbe de régression linéaire de du standard Flucloxacilline à 1% - FP	55
Figure 21- Répartition aléatoire des résidus de Flucloxacilline à 1% - Substances apparentées	57
Figure 22- Répartition aléatoire des résidus de Flucloxacilline à 1% dans la FP – Substances apparentées	57

Figure 23- Chromatogramme du blanc- Substances apparentées	63
Figure 24- Chromatogramme du placebo 2	64
Figure 25- Chromatogramme du témoin Flucloxacilline à 1%.....	64
Figure 26- Chromatogramme du témoin Impureté A.....	64
Figure 27- Chromatogramme du témoin Impureté B.....	65
Figure 28- Chromatogramme du témoin Impureté C.....	65
Figure 29- Chromatogramme du témoin Impureté D.....	65
Figure 30- Chromatogramme du témoin Impureté E	66
Figure 31- Chromatogramme de l'essai synthétique 1.....	66
Figure 32- Chromatogramme de l'essai synthétique 2.....	66
Figure 33- Ratio pureté du témoin Flucloxacilline à 1%.....	67
Figure 34- Ratio pureté du témoin Impureté A.....	67
Figure 35- Ratio pureté du témoin Impureté B.....	68
Figure 36- Ratio pureté du témoin Impureté C.....	68
Figure 37- Ratio pureté du témoin Impureté D.....	68
Figure 38- Ratio pureté du témoin Impureté E.....	69
Figure 39- Ratio pureté de l'impureté A de l'essai synthétique 1.....	69
Figure 40- Ratio pureté de l'impureté B de l'essai synthétique 1.....	69
Figure 41- Ratio pureté de l'impureté C de l'essai synthétique 1.....	70
Figure 42- Ratio pureté de l'impureté D de l'essai synthétique 1.....	70
Figure 43- Ratio pureté de l'impureté E de l'essai synthétique 2.....	70

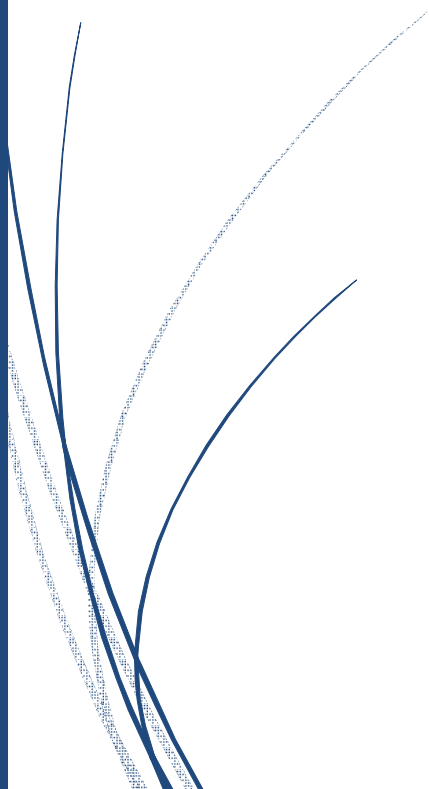
LISTE DES TABLEAUX

Tableau I- Matrice des recommandations ICH.....	22
Tableau II- Etalons primaires - validation analytique de la recherche des substances apparentées de la Flucloxacilline sodique	25
Tableau III- Conditions chromatographiques - méthode du dosage et de dissolution de Flucloxacilline sodique.....	26
Tableau IV- Conditions chromatographiques - méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique.....	27
Tableau V- Programme de gradient de la phase mobile.....	27
Tableau VI- Préparation des solutions tampon phosphate	28
Tableau VII- Préparation des solutions étalons	29
Tableau VIII- Préparation des solutions placebos.....	30
Tableau IX- Préparation des solutions essais.....	31
Tableau X- Paramètres de dissolution de Flucloxacilline dans les gélules	32
Tableau XI- Linéarité du dosage de Flucloxacilline - MP	35
Tableau XII- Linéarité du dosage de Flucloxacilline - FP.....	36
Tableau XIII- Analyse des résidus de linéarité du dosage de Flucloxacilline - MP	38
Tableau XIV- Analyse des résidus de linéarité du dosage de Flucloxacilline - FP	38
Tableau XV- Linéarité de la dissolution de Flucloxacilline - FP.....	40
Tableau XVI- Analyse des résidus de linéarité de dissolution de Flucloxacilline – FP.....	41
Tableau XVII- Récapitulatif des résultats de linéarité du dosage de Flucloxacilline dans la MP	42
Tableau XVIII- Récapitulatif des résultats de linéarité du dosage de Flucloxacilline dans la FP	43
Tableau XIX- Récapitulatif des résultats de linéarité de dissolution de Flucloxacilline dans la FP	44

Tableau XX- Exactitude du dosage de Flucloxacilline dans la MP	45
Tableau XXI- Exactitude du dosage de Flucloxacilline dans la FP	45
Tableau XXII- Exactitude de la dissolution de Flucloxacilline dans la FP	46
Tableau XXIII- Fidélité du dosage de Flucloxacilline dans la FP	48
Tableau XXIV- Paramètres de fidélité du dosage de Flucloxacilline dans la FP	48
Tableau XXV- Fidélité de dissolution de Flucloxacilline dans la FP	49
Tableau XXVI- Paramètres de fidélité de la dissolution de Flucloxacilline dans la FP	49
Tableau XXVII- Récapitulatif des résultats de spécificité du dosage de Flucloxacilline	53
Tableau XXVIII- Linéarité du dosage du standard de Flucloxacilline à 1%.....	54
Tableau XXIX- Linéarité du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP	54
Tableau XXX- Analyse des résidus de linéarité du dosage du standard de Flucloxacilline à 1% - MP	56
Tableau XXXI- Analyse des résidus de linéarité du dosage de Flucloxacilline 1% - FP	56
Tableau XXXII- Récapitulatif des résultats du dosage du standard de Flucloxacilline à 1%..	58
Tableau XXXIII- Récapitulatif des résultats du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP...	59
Tableau XXXIV- Exactitude du dosage du standard de Flucloxacilline à 1% dans la MP.....	60
Tableau XXXV- Exactitude du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP	60
Tableau XXXVI- Fidélité du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP	62
Tableau XXXVII- Récapitulatif des résultats de spécificité de la méthode de recherche des substances apparentées dans la FP	71
Tableau XXXVIII- Conditions chromatographiques appliquées pour l'analyse de Flucloxacilline par HPLC par différentes études.....	77



SOMMAIRE



INTRODUCTION GENERALE	1
I- REVUE DE LA LITTERATURE	3
1. Flucloxacilline	4
1.1. Structure chimique.....	4
1.2. Impuretés connues	4
1.3. Indications	5
1.4. Effets secondaires.....	6
2. Substances de référence.....	6
2.1. Etalon	6
2.1.1 Etalon primaire.....	7
2.1.2. Etalon secondaire	7
3. Chromatographie Liquide à Haute Performance	7
4. Dissolutest	10
5. Validation des méthodes analytiques	10
5.1. Spécificité.....	11
5.2. Linéarité	12
5.2.1. Linéarité et coefficient de corrélation	12
5.2.2. Linéarité et coefficient de détermination r^2	13
5.3. Exactitude.....	14
5.4. Fidélité = Précision.....	15
5.4.1. Répétabilité	16
5.4.2. Précision intermédiaire.....	16

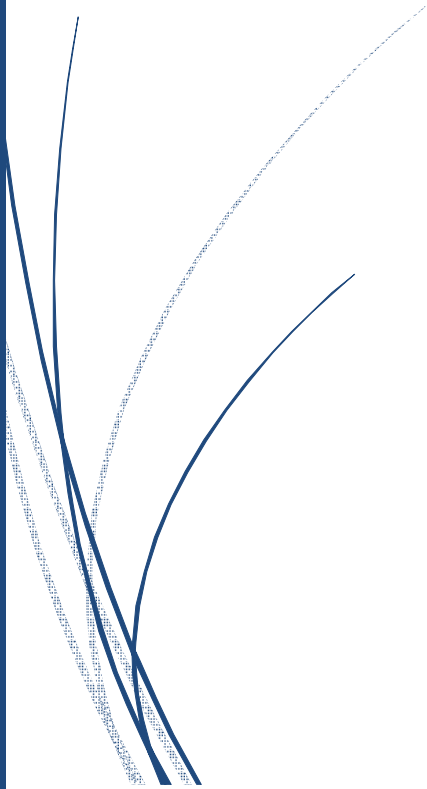
5.4.3. Reproductibilité.....	17
5.5. Robustesse.....	17
5.6. Limite de détection.....	17
5.6.1. Évaluation visuelle de la limite de détection.....	18
5.6.2. Approche du rapport signal/bruit de la limite de détection.....	18
5.6.3. Approche de l'écart-type de la réponse et de la pente de la courbe d'étalonnage de la limite de détection.....	18
5.7. Limite de quantification.....	19
5.7.1. Évaluation visuelle de la limite de quantification.....	20
5.7.2. Approche du rapport signal/bruit de la limite de quantification.....	20
5.7.3. Approche de l'écart-type de la réponse et de la pente de la courbe d'étalonnage de la limite de quantification.....	20
II- MATERIEL ET METHODES	23
1. Lieu et période d'étude.....	24
2. Présentation du médicament étudié.....	24
3. Matériel	24
3.1. Produits chimiques et réactifs	24
3.1.1. Substances de référence.....	24
3.1.2. Réactifs	25
3.2. Equipements.....	25
3.2.1. Equipement 1- Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance/ Barrettes Diodes	26
3.2.2. Equipement 2- Dissolutest.....	32
4. Approche de validation des méthodes analytiques.....	33

5. Analyse statistique	33
III- RESULTATS	34
1. Résultats de la validation des méthodes analytiques	35
1.1. Validation de la méthode du dosage et de dissolution de Flucloxacilline.....	35
1.1.1. Linéarité du dosage et de dissolution de Flucloxacilline.....	35
1.1.2. Exactitude du dosage et de dissolution de Flucloxacilline.....	44
1.1.3. Fidélité du dosage et de dissolution de Flucloxacilline dans la FP.....	47
1.1.4. Spécificité du dosage de Flucloxacilline	50
1.2. Validation de la méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline	53
1.2.1. Linéarité de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline	53
1.2.2. Exactitude de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline	59
1.2.3. Fidélité de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline	61
1.2.4. Spécificité de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline	63
1.2.5. Limite de détection et limite de quantification	72
IV- DISCUSSION	73
1. Méthodes conventionnelles d'analyse de la Flucloxacilline sodique	74
1.1. Méthodes Spectrophotométriques	74
1.2. Méthodes chromatographiques liquides à haute performance	75
1.2.1. Comparaison des conditions chromatographiques appliquées pour l'analyse de Flucloxacilline par HPLC par différentes études	76

1.2.2. Synthèse.....	78
2. Points forts et limites de l'étude	78
2.1. Points forts	78
2.2. Limites	78
2.2.1. Manque des données bibliographiques au niveau national pour la validation analytique de la flucloxacilline.....	78
2.2.2. Non évaluation de la robustesse dans la présente étude.....	79
CONCLUSION	80
RESUME	
ANNEXES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET WEBOGRAPHIQUES	



INTRODUCTION GENERALE



La validation des méthodes analytiques est un concept fondamental au sein des laboratoires de contrôle qualité de l'industrie pharmaceutique. Cette étape est essentielle afin d'une part, de se conformer aux exigences réglementaires, et d'autre part, dans une approche qualité, de développer la maîtrise des méthodes d'analyse, au quotidien.

Une méthode analytique est un moyen visant à exprimer concrètement un besoin bien exprimé, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné. Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnés, les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Par rapport à cette dernière, l'objectif d'une méthode analytique peut se résumer en sa capacité à quantifier chacune des quantités inconnues présentes dans un échantillon.

La mise en œuvre d'une méthode de dosage peut se décomposer en quatre grandes phases généralement successives telles que décrites ci-dessous :

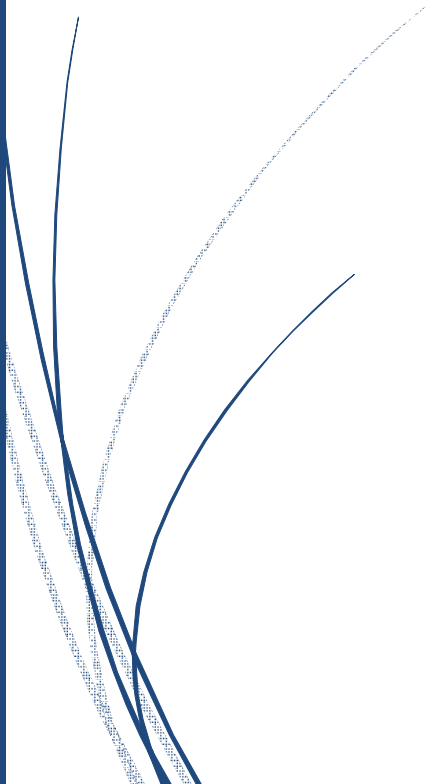
- une phase de Sélection où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis ;
- une phase de Développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences ;
- une phase de Validation (Validation Interne/Externe) précédée, selon les cas, d'une phase de pré-validation ;
- une phase d'application en routine (Usage en routine), incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.

L'exemple d'application, détaillé dans cette étude a pour objectif le développement et la validation de deux méthodes analytiques :

- la méthode de dosage et de dissolution de la Flucloxacilline dans le produit fini «Flucloxacilline 500 mg gélule» ;
- la méthode de recherche des substances apparentées de la Flucloxacilline dans le même produit fini «Flucloxacilline 500 mg gélule».



I- REVUE DE LA LITTÉRATURE



1. Flucloxacilline

1.1. Structure chimique

La Flucloxacilline est une pénicilline isoxazolylique dont la formule chimique est la suivante: (2S, 5R, 6R) -6-[[[3-(2-Chloro-6-fluorophényl)-5-méthylisoxazol-4-yl]carbonyl]amino]-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylate de sodium monohydraté (Figure 1) (1).

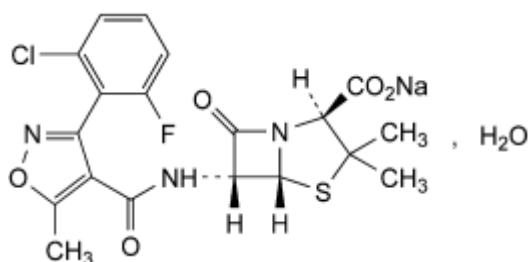


Figure 1 - Structure chimique de la Flucloxacilline sodique

1.2. Impuretés connues

La Flucloxacilline sodique présente les impuretés spécifiées suivantes: acide Penicilloïque (impureté A), acide Penilloïque (impureté B), acide 6-amino pénicillinique (impureté C), acide carboxylique 3-(2chloro-6-fluorophényl)-5-méthylisoxazole-4) (impureté D) et acide heptane-2-carboxylique (impureté E) dont les structures sont reportées dans les figures 2, 3, 4 et 5 (1).

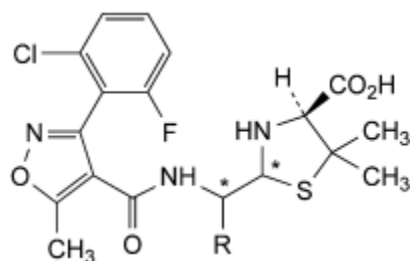


Figure 2 - Structure chimique de l'impureté A (R = CO₂H), et de l'impureté B (R = H)

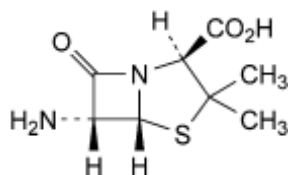


Figure 3- Structure chimique de l'impureté C

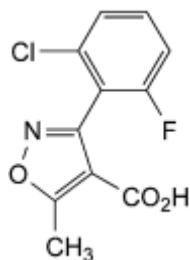


Figure 4- Structure chimique de l'impureté D

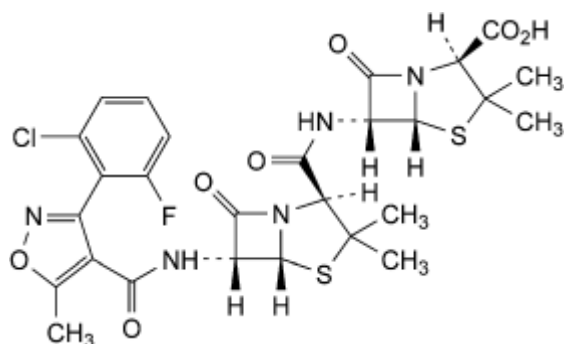


Figure 5- Structure chimique de l'impureté E

1.3. Indications

La Flucloxacilline est utilisée pour ses propriétés antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes à *Staphylococcus aureus* productrices de pénicillinase (2), (3), (4), notamment les infections :

- de la peau et des tissus sous-cutanés (impétigo, érysipèle, furoncles, abcès, phlegmons, etc.),

- des plaies et les brûlures,
- des os (arthrites, ostéites, etc.),
- de l'oreille (otite externe),
- des voies respiratoires (pneumonie, bronchopneumonie, etc.).
- la septicémie,
- la cellulite.

1.4. Effets secondaires

La Flucloxacilline peut provoquer (5), (6):

- des réactions du système immunitaire (choc anaphylactique, œdème de Quincke),
- des réactions allergiques chez les personnes prédisposées,
- des troubles digestifs,
- des douleurs musculaires.

Elle est contre indiquée chez les patients qui présentent une allergie aux pénicillines.

2. Substances de référence

On entend par substance de référence tout matériau uniforme, authentifié, destiné à être utilisé dans des tests chimiques et physiques spécifiés, au cours desquels ses propriétés sont comparées à celles du produit analysé, et qui possède un degré de pureté suffisant pour l'usage voulu (7).

En général ces propriétés sont définies par une autorité (organisme de certification) et portées à la connaissance de l'utilisateur par un certificat d'accompagnement de la substance, délivré par l'organisme de certification ; on a alors un matériau de référence certifié.

2.1. Etalon

Un étalon est une réalisation de la définition d'une grandeur donnée, avec une valeur déterminée et une incertitude de mesure associée, utilisée comme référence (8).

2.1.1 Etalon primaire

Un étalon primaire est un étalon qui est établi à l'aide d'une procédure de mesure primaire ou créé comme objet choisi par convention (8).

2.1.2. Etalon secondaire

Un étalon secondaire est un étalon qui est établi par l'intermédiaire d'un étalonnage par rapport à un étalon primaire d'une grandeur de même nature (8).

3. Chromatographie Liquide à Haute Performance

La chromatographie liquide est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire (9).

La phase mobile est une solution liquide, souvent constituée d'un mélange de solvant, et la phase stationnaire est un solide. Un mélange est entraîné à de fortes pressions par une phase mobile liquide à travers une colonne remplie de particules sphériques ou irrégulières, par exemple de la silice (10).

Les séparations par HPLC peuvent être effectuées en mode isocratique, lorsque la composition en solvants de la phase mobile demeure constante, ou en mode gradient, c'est-à-dire que la composition de la phase mobile varie durant l'analyse. Lors de l'utilisation d'un gradient, on débute toujours par une composition de phase mobile de polarité opposée à celle de la phase stationnaire, pour évoluer vers une polarité qui tend vers celle de la phase stationnaire (10).

L'appareillage se compose d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur). La phase mobile, délivrée à partir d'un ou plusieurs réservoirs, circule à travers la colonne, généralement à débit constant, puis passe à travers le détecteur (figure 6) (9).

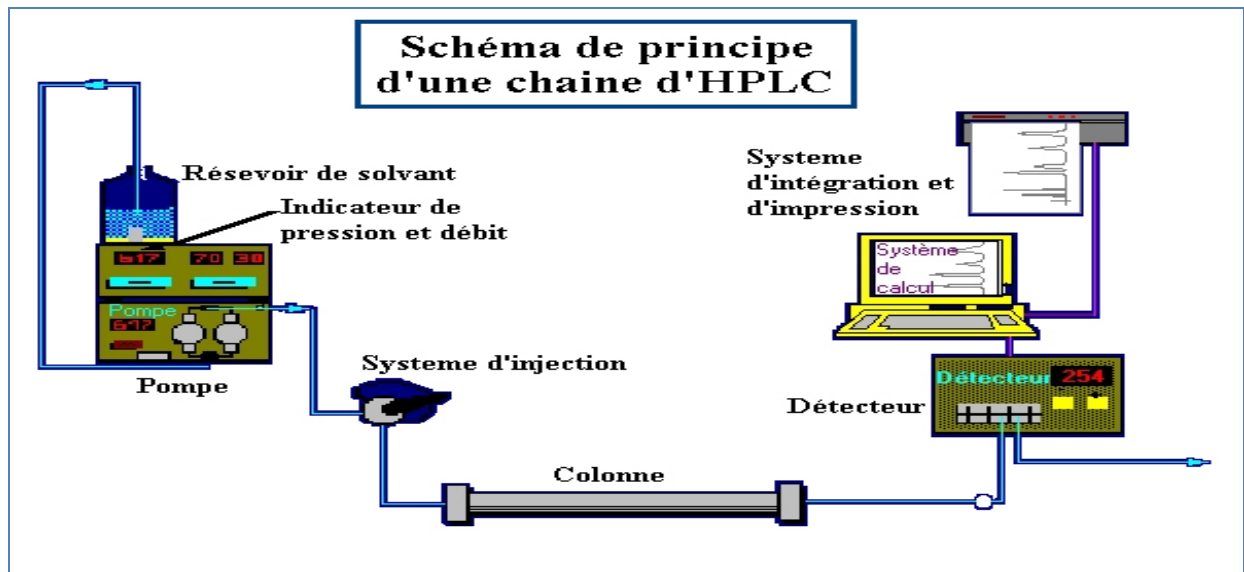


Figure 6- Composants d'une chaîne HPLC

- Systèmes de pompage

Les systèmes de pompage pour la CL doivent fournir la phase mobile à un débit contrôlé.

Les systèmes de pompage pilotés par microprocesseur sont capables de délivrer avec précision une phase mobile de composition constante (élution isocratique) ou variable (gradient d'élution) (9).

- Injecteurs

Le système d'injection doit être conçu de telle façon à fonctionner à pression élevée. Les injecteurs peuvent être à boucle fixe ou à volume variable, à fonctionnement manuel ou pilotés par un échantillonneur automatique (9).

- Phases stationnaires : Colonnes chromatographiques

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

- de la silice, de l'alumine ou du graphite poreux : chromatographie de partage.

- des résines ou polymères à groupements acides ou basiques : chromatographie à échange d'ions.
- de la silice ou des polymères poreux : chromatographie d'exclusion.
- divers supports chimiquement modifiés, préparés à partir de polymères, de silice ou de graphite poreux, utilisés en CL en phase normale (chromatographie d'absorption) ou en phase inversée, où la séparation repose principalement sur le partage des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire.

La plupart des séparations reposent sur des mécanismes de partage utilisant de la silice chimiquement modifiée comme phase stationnaire et des solvants polaires comme phase mobile (9).

▪ Phases mobiles

Pour la chromatographie en phase normale, les solvants organiques utilisés sont généralement de faible polarité. Pour la CL en phase inversée, on utilise des phases mobiles aqueuses, avec ou sans solvants organiques (9).

▪ Détecteurs

Les détecteurs les plus utilisés sont les spectrophotomètres dans l'ultraviolet/visible (UV/Vis), dont les détecteurs à barrette de diodes. La détection peut également reposer sur la fluorimétrie, la réfractométrie différentielle, des méthodes électrochimiques, la diffusion de la lumière, la détection d'aérosols chargés, la spectrométrie de masse, la radioactivité et d'autres méthodes particulières (9).

L'utilisation du principe de la diode photoélectrique en tant que récepteur dans un spectrophotomètre est réservée au montage de type multi canal, sous forme de barrette de diodes. Une barrette de diodes de quelques mm contient plusieurs centaines de diodes, chacune reçoit le rayonnement contenu dans un petit domaine spectral. Chacun des circuits élémentaires est exploré par un système pilote : par un micro-ordinateur. Ce système permet l'acquisition du spectre de l'échantillon en temps réel, une représentation en 3 dimensions (temps, absorbance, longueur d'onde) et une caractérisation des composés par leur spectre (9).

4. Dissolutest

L'essai de dissolution est destiné à déterminer la vitesse de dissolution des principes actifs des formes galéniques, d'estimer la libération du principe actif de sa forme galénique dans le tractus digestif et de garantir une qualité uniforme des formes solides.

L'essai de dissolution se réalise par le biais d'un dissolutest qui se compose des éléments suivants : un récipient qui peut être couvert, en verre ou autre matériau transparent inerte, un moteur ; un agitateur constitué d'une tige servant d'axe moteur et d'un panier cylindrique. Le récipient est partiellement immergé dans un bain d'eau thermostaté de taille appropriée ou chauffé par un dispositif approprié tel un chauffe-ballon. Le bain d'eau ou le dispositif chauffant permet de maintenir à l'intérieur du récipient une température de $37 \pm 0,5$ °C pendant l'essai et d'assurer un mouvement fluide et constant du milieu de dissolution.

Le récipient est de forme cylindrique, à fond hémisphérique d'une contenance de 1 L. Il présente une hauteur de 160-210 mm et un diamètre intérieur de 98-106 mm. La tige est positionnée de telle sorte que son axe ne s'écarte en aucun point de plus de 2 mm de l'axe vertical du récipient et que sa rotation soit uniforme et sans oscillation significative susceptible d'affecter les résultats. L'appareil est équipé d'un dispositif permettant de régler la vitesse de rotation de la tige et de la maintenir à une valeur spécifiée, à ± 4 pour cent près(11).

5. Validation des méthodes analytiques

La clause 5.4.5.1. de la norme ISO 17025:2005 définit la **validation**: « La validation est la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » (12).

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ICH, notamment le guideline ICH Q2 (R1) paru en 2005 : «Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology» (13). Son but est de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement. Ce guideline ICH

est une exigence réglementaire, toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) doit répondre à ses exigences.

Il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires, comme les guides de validation analytique de la SFSTP :

- SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP »

- I. Méthodologie, paru dans STP Pharma Prat. en 1992 (14);
- II. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. en 1992 (15);

- SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Prat. en 1997 (16).

- SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »

- I. Généralités, paru dans STP Pharma Prat. en 2003 (17).
- II. Statistiques, paru dans STP Pharma Prat. en 2006 (18).
- III. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. en 2006 (19).
- IV. Exemples d'application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008 (20).

Ces guides ont été élaborés dans le but d'aider les industriels à valider leurs procédures analytiques en appliquant les recommandations réglementaires, dans le but d'obtenir une AMM.

La validation analytique d'une méthode correspond à l'étude de plusieurs critères de validation définis ci-après.

5.1. Spécificité

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc.

Concrètement, la méthode est testée sur les autres produits présents dans le médicament afin de vérifier leur non interférence. Il y a également la possibilité d'effectuer une étude de dégradation forcée où plusieurs conditions sont testées pour faire apparaître des produits de dégradation : stress thermique, stress à la lumière, stress oxydant, stress acide et stress basique (13).

5.2. Linéarité

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

L'étude de linéarité représente en fait une étude de régression, la méthode consiste à étudier la liaison et sa présentation par un modèle mathématique lorsque l'une des grandeurs n'est pas aléatoire et peut être fixée au gré de l'expérimentateur.

Dans le cas d'une validation de dosage par chromatographie, on va vérifier si la relation entre les quantités injectées et les réponses obtenues sont proportionnelles. La présentation la plus simple de cette proportionnalité est le modèle linéaire.

Si le modèle linéaire n'est pas la seule représentation mathématique utilisable, le cas idéal serait une droite, cette droite pouvant passer par zéro (13).

5.2.1. Linéarité et coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation est le reflet de la puissance de la liaison entre deux caractères quantitatifs (concentration 'y' et réponses 'x').

Le calcul de coefficient de corrélation n'est intéressant que pour vérifier l'absence de liaison, l'interprétation du coefficient de corrélation est peu précise pour vérifier l'existence d'une liaison forte. En effet si r est voisin de l'unité, l'écart entre le r calculé et $r = 1$ peut être du soit à une variance résiduelle élevée soit à une régression non linéaire (21), (22).

Pour toutes ces raisons l'utilisation et l'interprétation du coefficient de corrélation ne constituent pas un paramètre critique de l'étude de linéarité mais doit être considéré comme un paramètre d'appréciation de la linéarité lorsqu'il est associé à un examen visuel de la droite.

5.2.2. Linéarité et coefficient de détermination r^2

Le coefficient de détermination peut être interprété comme la proportion de la variance de y imputable à la variance de x . il compare les valeurs y estimées aux valeurs réelles et varie entre 0 et 1, un coefficient de détermination égal à 1 indique une corrélation parfaite (aucune différence entre les valeurs y estimées et réelles) (21), (22).

Comme l'interprétation du coefficient de corrélation, la seule évaluation du coefficient de détermination n'est pas suffisante pour démontrer la linéarité de la relation entre concentration x et réponses y . on utilise un test de Fisher (annexe 1) : test de validité de la droite de régression. Pour démontrer si la relation observée entre les variables dépendantes et indépendantes est due au hasard.

La stratégie la plus courante pour estimer la linéarité d'une méthode (sur un intervalle de concentration centré sur la valeur cible) est d'effectuer un test de dépendance linéaire : test de Fisher afin de vérifier la liaison des valeurs entre elles (23), (24).

La validité de la droite de régression est vérifiée par un second test de Fisher d'ajustement linéaire, ce test permet d'estimer l'erreur expérimentale.

Un test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro permet de vérifier si la droite de régression passe par zéro : test de Student (annexe2) (23), (24) .

Le test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro lorsqu'il est significatif permet de mesurer l'effet éventuel de l'existence d'un biais.

La linéarité s'exprime au moyen d'un calcul statistique, il faut donc un nombre minimum de résultats d'analyse (données brutes) avant de pouvoir l'apprécier. On admet qu'il faut au moins travailler sur 5 échantillons de concentrations différentes, répartis sur tout le domaine de validité recherché. Chaque échantillon faisant l'objet d'une étude de répétabilité

comportant au moins trois essais répliqués. La linéarité se déterminera sur au moins 15 points de mesure couvrant tout le domaine de validité supposé de la méthode d'analyse.

L'étude de linéarité consiste en l'étude parallèle d'une gamme de concentrations obtenues à partir de la FP reconstituée et d'une gamme obtenue à partir de la solution de référence du principe actif à étudier.

Les valeurs statistiques sont à comparer aux valeurs statistiques tabulées au risque statistique considéré. La consultation des graphiques (graphique des résidus, droites de régression) permet de vérifier l'alignement des points, de comparer les droites de régression ou de suspecter une valeur aberrante.

En outre, l'analyse des résidus permet de vérifier que la linéarité s'applique de façon identique à la totalité du domaine de concentration étudié qui définit l'intervalle de validité de la linéarité.

5.3. Exactitude

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention.

Le terme exactitude, appliqué à un ensemble de résultats d'essai, implique une combinaison de composantes aléatoires et d'une erreur systématique commune ou d'une composante de biais (25).

Un biais résulte de la comparaison entre une concentration trouvée par rapport à une concentration théorique sur le domaine de validité supposé de la méthode (25).

$$\text{Biais absolu} = \bar{X} - \mu$$

$$\text{Biais relatif (\%)} = \text{ER} = 100 \times \frac{\bar{X} - \mu}{\mu}$$

$$\text{(\%)} \text{ de recouvrement} = \text{TR} = 100 \times \frac{\mu}{\bar{X}}$$

Où :

\bar{X} : Quantité trouvée,

μ : Quantité théorique,

ER : Erreur relative,

TR : Taux de recouvrement.

Une méthode est considérée exacte lorsque la valeur 100% est incluse dans l'intervalle de confiance (26).

5.4. Fidélité = Précision

La précision d'une méthode correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites. La précision peut s'évaluer à trois niveaux : répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité (13).

L'évaluation de la précision doit se faire au moyen d'échantillons homogènes et authentiques.

S'il est impossible d'obtenir des échantillons homogènes, on peut utiliser des échantillons préparés artificiellement ou une solution d'échantillon.

La fidélité de la méthode est exprimée par le coefficient de variation (%CV) obtenu en effectuant le rapport entre l'écart-type et la moyenne des réponses.

Le coefficient de variation $CV = (\sigma / \bar{X}) \times 100$

L'intervalle de confiance : $IC95 = \bar{X} \pm t \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$

Où:

σ : Ecart type

\bar{X} : Moyenne

IC95 : Intervalle de confiance à 95%

t : Coefficient de Student à rechercher dans la table de Student (annexe 2).

n : nombre d'échantillons.

5.4.1. Répétabilité

La répétabilité est une expression de la précision de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps. La répétabilité est aussi désignée « précision intra-analyse » (13).

Pour évaluer la répétabilité, il faut :

- Au moins neuf mesures englobant l'écart d'utilisation de la méthode (c'est-à-dire trois concentrations avec trois échantillons chacune) ;

ou

- Au moins six mesures d'une concentration à 100 % de la teneur escomptée.

5.4.2. Précision intermédiaire

La précision intermédiaire ou fidélité intermédiaire correspond aux variations survenant dans un même laboratoire : analyses effectuées à des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc.

La fidélité intermédiaire consiste à établir les effets d'événements aléatoires sur la fidélité de la procédure d'analyse au sein d'un même laboratoire.

Des essais effectués sur des produits identiques, dans des circonstances présumées identiques, ne conduisent pas toujours à des résultats identiques. Cela est dû à l'existence d'erreurs à caractère aléatoire inhérente à toute méthode d'analyse. Les facteurs susceptibles d'influer sur le résultat d'un essai ne peuvent pas en effet être tous contrôlés. Dans l'interprétation pratique des résultats d'un essai, il est nécessaire de tenir compte de cette variabilité.

En dehors des erreurs de type systématique, de nombreux facteurs peuvent contribuer à la variabilité d'une méthode comme l'opérateur, l'équipement utilisé, l'étalonnage de l'équipement, l'environnement, le temps ou encore les réactifs.

Cette variabilité est plus grande lorsque les essais à comparer ont été effectués par des opérateurs et/ou avec des instruments différents que lorsqu'ils ont été obtenus par le même opérateur utilisant le même équipement. La fidélité intermédiaire de la méthode peut être partiellement assurée par un suivi des paramètres opératoires prouve du bon déroulement de l'analyse (13).

5.4.3. Reproductibilité

La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie). La variabilité de méthode est alors testée dans des conditions maximales. La principale difficulté dans l'estimation de la reproductibilité réside dans la distribution de l'échantillon initial homogène entre les différents laboratoires concernés (13).

Pour l'étude de la fidélité, les textes préconisent d'utiliser un même échantillon d'un même lot homogène ou d'un reconstitué.

5.5. Robustesse

L'évaluation de la robustesse se fait durant la phase de mise au point ; elle dépend du type de méthode considérée. Cette évaluation doit démontrer que la méthode demeure fiable lorsqu'on introduit des variations planifiées de paramètres (13).

Si les résultats peuvent varier selon les conditions d'analyse, il faut veiller à ce que celles-ci soient adéquatement contrôlées ou recommander certaines précautions dans la marche à suivre. L'évaluation de la robustesse a notamment pour conséquence la définition d'un ensemble de paramètres sur le caractère approprié de la méthode d'analyse (p. ex., un test de résolution) qui permet de garantir la validité de cette méthode, quelles que soient les conditions d'utilisation. Quelques exemples de variations caractéristiques :

- Stabilité des solutions d'analyse ;
- Variations du pH de la phase mobile ;
- Variations de la composition de la phase mobile ;
- Colonnes différentes (provenant de lots ou de fournisseurs différents), etc....

5.6. Limite de détection

La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte.

La limite de détection peut être déterminée par diverses méthodes, l'approche variant selon que la méthode à valider fait intervenir ou non des instruments. Des approches sont énumérées ci-dessous (13).

5.6.1. Évaluation visuelle de la limite de détection

La limite de détection des méthodes ne faisant pas intervenir d'instruments peut être déterminée par évaluation visuelle ; cette approche peut aussi être employée pour des méthodes faisant intervenir des instruments.

Pour déterminer la limite de détection, on analyse des échantillons renfermant des concentrations connues de la substance à analyser et l'on détermine la concentration minimum à laquelle la substance peut être détectée de façon fiable.

5.6.2. Approche du rapport signal/bruit de la limite de détection

Cette approche ne convient qu'aux méthodes d'analyse avec un bruit de fond.

Pour déterminer le rapport signal/bruit, on compare le signal obtenu avec des échantillons contenant de faibles concentrations connues de la substance à analyser au signal obtenu avec des blancs, et on détermine la concentration la plus faible à laquelle la substance peut être détectée de façon fiable. En général, un rapport signal/bruit de 3 ou 2 pour 1 est considéré comme acceptable pour l'estimation de la limite de détection.

5.6.3. Approche de l'écart-type de la réponse et de la pente de la courbe d'étalonnage de la limite de détection

La limite de détection peut être représentée par la formule suivante :

$$LD = 3,3 s / P$$

Où :

s : écart-type de la réponse

P : pente de la courbe d'étalonnage

On peut estimer la pente (P) de la courbe d'étalonnage de la substance à analyser. La valeur de l'écart-type s peut être estimée de diverses manières, nous en donnons quelques exemples ci-après.

- D'après l'écart-type de blancs

Pour mesurer l'importance de la réponse de fond, on analyse un nombre suffisant de blancs, puis on détermine l'écart-type des valeurs obtenues.

- D'après la courbe d'étalonnage

On trace une courbe d'étalonnage d'après les résultats de l'analyse d'échantillons contenant la substance à analyser à des concentrations comprises dans l'écart de limite de détection. Comme écart-type, on peut utiliser l'écart-type résiduel d'une courbe de régression ou l'écart-type de l'ordonnée à l'origine de courbes de régression.

Il convient d'indiquer la limite de détection et de préciser par quelle méthode on l'a déterminée. Si on a utilisé l'évaluation visuelle ou le rapport signal/bruit, la présentation des chromatogrammes correspondants est considérée comme une justification acceptable.

Lorsque la limite de détection est estimée par calcul ou extrapolation, on peut valider l'estimation en analysant par une méthode indépendante un nombre suffisant d'échantillons dont la teneur en substance à analyser est proche de la limite de détection ou coïncide avec cette limite.

5.7. Limite de quantification

La limite de quantification ou la limite de dosage d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude. La limite de dosage est un paramètre des analyses quantitatives des composés présents en faibles quantités dans les matrices d'échantillon, elle est plus particulièrement utilisée dans le dosage des impuretés et (ou) des produits de dégradation.

La limite de dosage peut être déterminée par diverses méthodes, l'approche variant selon que la méthode à valider fait intervenir ou non des instruments. Des approches sont énumérées ci-dessous, mais d'autres méthodes peuvent aussi être acceptables (13).

5.7.1. Évaluation visuelle de la limite de quantification

Pour déterminer la limite de dosage, on analyse généralement des échantillons renfermant des concentrations connues de la substance à analyser et l'on détermine la concentration minimum à laquelle la substance peut être dosée avec exactitude et précision.

5.7.2. Approche du rapport signal/bruit de la limite de quantification

Cette approche ne convient qu'aux méthodes d'analyse avec un bruit de fond.

Pour déterminer le rapport signal/bruit, on compare le signal obtenu avec des échantillons contenant de faibles concentrations connues de la substance à analyser au signal obtenu avec des blancs, et on détermine la concentration la plus faible à laquelle la substance peut être quantifiée de façon fiable. En général, le rapport signal/bruit est de 10 pour 1.

5.7.3. Approche de l'écart-type de la réponse et de la pente de la courbe d'étalonnage de la limite de quantification

La limite de dosage peut être représentée par la formule suivante :

$$LQ = 10 s / P$$

Où :

s : écart-type de la réponse

P : pente de la courbe d'étalonnage

On peut estimer la pente (P) de la courbe d'étalonnage de la substance à analyser. La valeur de l'écart-type s peut être estimée de diverses manières, nous en donnons quelques exemples ci-après.

- D'après l'écart-type de blancs

Pour mesurer l'importance de la réponse de fond, on analyse un nombre suffisant de blancs, puis on détermine l'écart-type des valeurs obtenues.

- D'après la courbe d'étalonnage

On trace une courbe d'étalonnage d'après les résultats de l'analyse d'échantillons contenant la substance à analyser à des concentrations comprises dans l'écart de limite de dosage. Comme écart-type, on peut utiliser l'écart-type résiduel d'une courbe de régression ou l'écart-type de l'ordonnée à l'origine de courbes de régression.

Il convient d'indiquer la limite de dosage et de préciser par quelle méthode on l'a déterminée.

La limite de dosage doit être validée par l'analyse d'un nombre suffisant d'échantillons dont la teneur en substance à analyser est proche de la limite de dosage ou coïncide avec cette limite.

Il faut souligner qu'une validation analytique complète consiste à évaluer : l'écart d'utilisation ou intervalle de mesure, la spécificité, la linéarité, l'exactitude, la fidélité, la limite de détection, la limite de quantification et la robustesse. Ces paramètres sont réalisés suivant la nature du test à valider, il s'agit des caractéristiques qu'il convient habituellement de valider, mais il y a parfois des exceptions et celles-ci doivent être traitées individuellement (tableau I).

Tableau I- Matrice des recommandations ICH

Type d'analyse	Identification	Analyse des impuretés		Dosage
		Teneur	Limite	- dissolution (mesure seulement) - teneur/activité
Exactitude	-	+	-	+
Précision				
Répétabilité	-	+	-	+
Précision intermédiaire	-	+ (1)	-	+ (1)
Spécificité (2)	+	+	+	+
Limite de détection	-	- (3)	+	-
Limite de dosage	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Ecart d'utilisation	-	+	-	+

(-) : Caractéristique qui n'est normalement pas évaluée

(+) : Caractéristique normalement évaluée

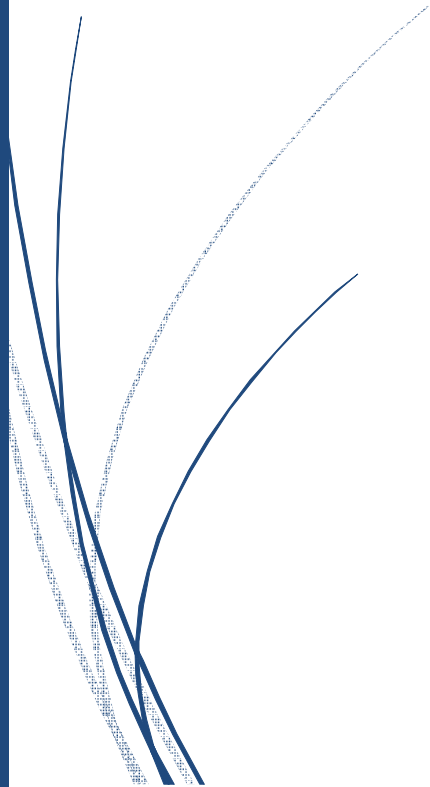
(1) : Si la reproductibilité est évaluée, il n'est pas nécessaire de déterminer la précision intermédiaire.

(2) : Si la méthode est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité d'une ou de plusieurs autres épreuves complémentaires auxquelles l'échantillon est soumis.

(3) : Parfois nécessaire.



II- MATERIEL ET METHODES



1. Lieu et période d'étude

Notre étude est pratique portant sur la validation analytique d'une méthode de dosage, de dissolution et de recherche des substances apparentées d'un principe actif « Flucloxacilline » dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélule » durant une période de 3 mois s'étendant de 30/03/2016 au 30/06/2016 au niveau du Laboratoire Contrôle Qualité de l'industrie pharmaceutique Saham Pharma.

Saham Pharma est une filiale du groupe SAHAM, située à Ain Aouda dans la région de Rabat, ce laboratoire pharmaceutique a été créé en mars 2011 par l'acquisition de l'unité de production de GlaxoSmithKline. Le laboratoire pharmaceutique Saham Pharma a comme activités principales la fabrication des médicaments pénicilliniques de formes sèches : poudres pour suspension buvable, comprimés, sachets et gélule ainsi que l'étiquetage, le stockage et la livraison des produits finis fabriqués localement et importés.

2. Présentation du médicament étudié

Le médicament objet de notre étude est composé de 500 mg du principe actif « Flucloxacilline sodique » et de l'excipient « stéarate de magnésium » dans la forme pharmaceutique (FP) gélule.

3. Matériel

3.1. Produits chimiques et réactifs

3.1.1. Substances de référence

a- Etalons primaires

Les étalons primaires utilisés dans le cadre de cette étude sont reportés dans le tableau II, ces étalons nous ont été fournis par la pharmacopée européenne.

Tableau II- Etalons primaires - validation analytique de la recherche des substances apparentées de la Flucloxacilline sodique

Etalon primaire	Pureté (w/w)
Impureté A : acide Penicilloïque(*)	83,0%
Impureté B : acide Penilloïque(*)	97,3%
Impureté C : acide 6-amino pénicillinique(*)	99,7%
Impureté D : acide carboxylique 3-(2chloro-6-fluorophenyl)-5-methylisoxazole-4) (*)	94,1%
Impureté E : acide heptane-2-carboxylique(*)	NA

(*) : Impuretés connues de la Flucloxacilline sodique

NA : Non applicable

b- Etalon secondaire

L'étalon secondaire utilisé dans le cadre de cette étude est la Flucloxacilline sodique, il est d'une pureté de 91,5%, il nous a été fourni par le laboratoire GlaxoSmithKline.

3.1.2. Réactifs

Les réactifs utilisés pour la préparation de la phase mobile sont les suivants :

- Dihydrogénophosphate de sodium dihydraté et l'acide orthophosphorique pour la préparation de la solution tampon phosphate.
- Acétonitrile
- NaOH à 10% (m/v)

3.2. Equipements

Les équipements utilisés dans le cadre de réalisation de cette étude sont comme suit :

- Une chaîne HPLC de marque Agilent 1200 series, composée d'une pompe quaternaire, d'un détecteur à barrettes diodes, d'un dégazeur, d'un injecteur automatique, d'un four colonne et d'un Rack à effet Peltier. La chaîne est pilotée par le logiciel ChemStation.
- Une chaîne HPLC de marque Merck, composée pompe, d'un détecteur à barrettes diodes, d'un dégazeur, d'un injecteur automatique et d'un Rack à effet Peltier. La chaîne est pilotée par le logiciel EZChrome.

- Un dissolutest de marque PHARMA TEST, composé des récipients cylindriques à fond hémisphérique, chacun étant muni d'un couvercle, d'une capacité de 1 litre, des agitateurs constitués par une tige verticale dont la partie inférieure est fixée dans un panier cylindrique, et d'un bain d'eau thermostaté qui permet de maintenir la température du milieu de dissolution à la température requise pendant l'essai.
- Une balance électronique de précision de marque Mettler Toledo XS 205.
- Un thermomètre modèle ME005.

3.2.1. Equipement 1- Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance/ Barrettes Diodes

a- Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques de la validation analytique de la méthode du dosage et de dissolution de Flucloxacilline sodique sont reportées dans le tableau III.

Tableau III- Conditions chromatographiques - méthode du dosage et de dissolution de Flucloxacilline sodique

Paramètre	Description
Colonne	Lichrosorb® 100 RP C18 (250 x 4mm, 5µm)
Détecteur	Détecteur UV à barrette diode à 225 nm
Température de l'injecteur	8°C
Débit	1,5 ml /min
Volume d'injection	10 µl
Phase mobile	Mélange de la solution tampon phosphate à pH 4,0 et acétonitrile (70 V : 30 V) au niveau de la pompe

V : Volume

Les conditions chromatographiques de la validation analytique de la méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique ainsi que le programme de gradient utilisé sont reportés respectivement dans le tableau IV et le tableau V.

Tableau IV- Conditions chromatographiques - méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique

Paramètre	Description
Colonne	Hypersil® ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm)
Détecteur	UV à barrette diode à 225 nm
Température four colonne	40°C
Débit	2,2 ml/min
Volume d'injection	10 µl
Phase mobile	Programme de gradient

Tableau V- Programme de gradient de la phase mobile

Temps (min)	Solution tampon phosphate pH 6,8 (%)	Acétonitrile (%)
0,00	83	17
4,00	83	17
10,00	75	25
35,00	75	25
41,00	83	17
50,00	83	17

b- Préparation des solutions

▪ Solution tampon phosphate

Les modalités de préparation de la solution tampon phosphate sont reportées dans le tableau VI.

Tableau VI- Préparation des solutions tampon phosphate

Méthode du dosage et de dissolution de Flucloxacilline sodique	
Tampon phosphate 0,05 M à pH 4,0	<ul style="list-style-type: none">- Peser 7,8 g de dihydrogénophosphate de sodium dihydraté,- La dissoudre dans une fiole jaugée de 1000 ml avec de l'eau purifiée,- Ajuster le pH de la solution à 4,0 avec l'acide orthophosphorique dilué,- Compléter au volume avec de l'eau purifiée,- Filtrer la solution à travers une membrane de porosité 0,45µm.
Méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique	
Tampon phosphate 0,02 M à pH 6,8	<ul style="list-style-type: none">- Peser 3,12 g de dihydrogénophosphate de sodium dihydraté,- La dissoudre dans une fiole jaugée de 1000 ml avec de l'eau purifiée,- Ajuster le pH de la solution à 6,8 avec le NaOH à 10% (m/v) et compléter au volume avec l'eau purifiée,- Filtrer la solution à travers une membrane de porosité 0,45µm.

▪ Solutions étalons

Les modalités de préparation des solutions étalons sont reportées dans le tableau VII.

Tableau VII- Préparation des solutions étalons

Méthode du dosage et de dissolution de Flucloxacilline sodique	
Etalon secondaire : Flucloxacilline sodique	<ul style="list-style-type: none"> - Peser une quantité de 100 mg de Flucloxacilline sodique à 100% et l'introduire dans une fiole jaugée de 200 ml, - Compléter au volume avec de l'eau purifiée et agiter, - Filtrer à travers un filtre à seringue de 0,45 µm.
Méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique	
Etalon secondaire : Flucloxacilline sodique à 1%	<ul style="list-style-type: none"> - Peser une quantité de 20 mg de Flucloxacilline sodique à 100% et l'introduire dans une fiole jaugée de 200 ml, - Compléter au volume avec le tampon pH 6,8 , - Introduire 2 ml de la solution précédente dans une fiole de 20 ml et compléter au volume avec le même solvant, - Filtrer à travers un filtre à seringue de 0,45 µm.
Etalons primaires : impuretés A, B, C et D de la Flucloxacilline sodique	<ul style="list-style-type: none"> - Peser exactement 20 mg de chacune des impuretés témoins de la Flucloxacilline sodique citées dans le tableau II du paragraphe 3.1.1, - Dissoudre la prise d'essai dans 200 ml de tampon pH 6,8 et agiter, - Introduire pour chaque impureté 2 ml de la solution précédente dans une fiole de 20 ml, - Compléter au volume avec le même solvant.

▪ Solutions placebo

La modalité de préparation des solutions placebos est reportée dans le tableau VIII.

Tableau VIII- Préparation des solutions placebos

Méthode du dosage et de dissolution de Flucloxacilline sodique	
Solution placebo 1	<ul style="list-style-type: none">- Peser une quantité de stéarate de magnésium équivalente à celle contenue dans une gélule et l'introduire dans une fiole jaugée de 1000 ml,- Ajouter 900 ml d'eau purifiée et agiter, compléter au volume avec de l'eau purifiée.
Méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique	
Solution placebo 2	<ul style="list-style-type: none">- Peser une quantité équivalente à celle contenue dans 4 gélules et l'introduire dans une fiole jaugée de 500 ml,- Compléter au volume avec le tampon pH 6,8 et agiter,- Introduire 5ml de la solution précédente dans une fiole de 20 ml et compléter au volume avec le même solvant de dilution.

▪ Solutions essais

Les modalités de préparation des solutions essais sont reportées dans le tableau IX.

Tableau IX- Préparation des solutions essais

Méthode du dosage de Flucloxacilline sodique	
Solution essai	<ul style="list-style-type: none"> - Peser l'équivalent du poids d'une gélule et l'introduire dans une fiole de 1000 ml, - Compléter au volume avec l'eau purifiée et agiter, - Filtrer à travers un filtre à seringue de 0,45 µm.
Méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique	
Solution essai	<ul style="list-style-type: none"> - Peser l'équivalent de 2 g de Flucloxacilline et l'introduire dans une fiole jaugée de 500 ml, - Compléter au volume avec le tampon pH 6,8, - Introduire 5 ml de la solution précédente dans une fiole jaugée de 20 ml et compléter au volume avec le même solvant, - Filtrer à travers un filtre à seringue de 0,45 µm.
Solution essai synthétique 1 des impuretés A, B, C et D	<ul style="list-style-type: none"> - Introduire une quantité de stéarate de magnésium équivalente à celle contenue dans 4 gélules dans une fiole jaugée de 500 ml, - Compléter au volume avec le tampon pH 6,8 et agiter, - Introduire 5 ml de la solution de stéarate de magnésium dans une fiole jaugée de 20 ml et ajouter un volume de chaque solution mère des impuretés A, B, C et D. - Compléter au trait de jauge avec le même solvant puis filtrer à travers un filtre à seringue de 0,45µm. - Utiliser le filtrat comme solution essai synthétique 1.
Solution essai synthétique 2 de l'impureté E	<ul style="list-style-type: none"> - Introduire 5 ml de la solution de stéarate de magnésium dans une fiole jaugée de 10 ml et ajouter le contenu du flacon de l'impureté E, - Compléter au volume avec le même solvant puis filtrer à travers un filtre à seringue de 0,45µm, - Utiliser le filtrat comme solution essai synthétique 2.

3.2.2. Equipement 2- Dissolutest

a- Conditions d'étude de la dissolution

L'étude de la dissolution de Flucloxacilline sodique dans la FP gélule a été réalisée par le dissolutest Pharma Test dont les paramètres sont définis dans le tableau X.

Tableau X- Paramètres de dissolution de Flucloxacilline dans les gélules

Paramètre	Description
Milieu de dissolution	Eau purifiée
Volume de dissolution	900 ml \pm 1%
Température du milieu de dissolution	37 \pm 0,5°C
Vitesse d'agitation	75rpm
Durée de dissolution	30 min

rpm : rotation par minute

b- Préparation des solutions

▪ Solution essai

Le test de dissolution a été réalisé sur des unités de prise en utilisant l'appareil de dissolution à paniers tournants disponible au niveau du laboratoire d'analyse et comme décrit dans la Ph. Eur en vigueur.

Equilibrer le milieu de dissolution à 37 \pm 0,5°C et vérifier la température avec un thermomètre étalonné. Peser la gélule puis en placer une par panier (le panier doit être sec), fixer ensuite les paniers sur les arbres d'agitation et descendre l'ensemble dans les bols et mettre les couvercles. Dans un intervalle de temps spécifié : à l'aide d'une seringue prélever immédiatement un échantillon du milieu de dissolution dans une zone située à mi-distance de la surface du milieu de dissolution et du haut du panier et à au moins 1 cm de la paroi du récipient et filtrer les échantillons prélevés à l'aide d'un filtre à seringue de 0,45 μ m.

4. Approche de validation des méthodes analytiques

Le procédé a été validé par la détermination de la spécificité, la linéarité, l'exactitude, la fidélité, la limite de détection et la limite de quantification selon les directives de l'Internationale Conférence sur l'Harmonisation (ICH) (13).

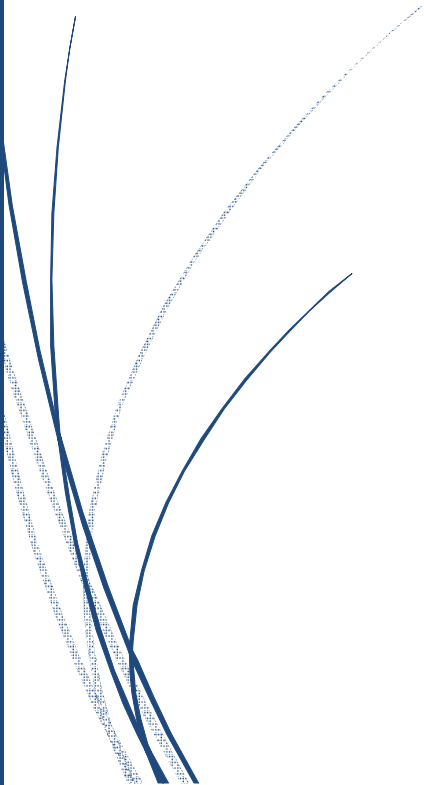
5. Analyse statistique

Le logiciel Microsoft office Excel version 2007 a été utilisé pour la saisie et le traitement statistique des données. L'analyse statistique a consisté au calcul des paramètres suivants :

- Analyse de variance ;
- Coefficient de corrélation ;
- Pente et ordonnée à l'origine ;
- Réponses prévisionnelles des aires des pics ;
- Résidus et résidus relatifs ;
- Signification pratique de l'ordonnée à l'origine ;
- Signification de F ;
- Pourcentage de recouvrement ;
- Coefficients de variation ;
- Variance ;
- Ecart type.



III- RESULTATS



1. Résultats de la validation des méthodes analytiques

La confirmation de la validation de la méthode du dosage, de dissolution et de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélule » dans la suite de ce travail est basée sur l'étude de chaque paramètre énoncé précédemment : la linéarité, l'exactitude, la fidélité, la spécificité, la limite de détection et la limite de quantification.

1.1. Validation de la méthode du dosage et de dissolution de Flucloxacilline

1.1.1. Linéarité du dosage et de dissolution de Flucloxacilline

a- Linéarité du dosage

La linéarité du dosage de Flucloxacilline dans la matière première (MP) et dans la forme pharmaceutique (FP) a été évaluée à partir de 5 niveaux de concentration (70%, 85%, 100%, 115% et 130%) de la quantité nominale à doser avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau (n=3) et dans un intervalle de confiance de 95% ($p < 0,05$). Les résultats de linéarité du standard et de la FP sont reportés respectivement dans les tableaux XI et XII.

Tableau XI- Linéarité du dosage de Flucloxacilline - MP

% de la cible	Quantité nominale de Flucloxacilline (mg)	Aires des pics
70	69,997	4929,316
	69,906	4908,294
	70,089	4959,254
85	85,278	6009,526
	85,186	6018,116
	84,912	5999,111
100	100,009	7075,994
	100,009	7055,766
	100,009	7067,645
115	114,924	8110,915
	115,015	8132,451
	115,015	8145,692
130	129,930	9191,897
	130,204	9214,552
	129,930	9224,640

Tableau XII- Linéarité du dosage de Flucloxacilline - FP

% de la cible	Quantité nominale de Flucloxacilline (mg)	Aires des pics
70	349,800	5037,820
	349,980	5037,639
	350,070	5036,430
85	424,867	6119,591
	424,957	6114,887
	424,957	6121,005
100	500,203	7190,624
	499,933	7209,308
	500,023	7202,201
115	574,820	8259,972
	575,000	8275,400
	575,360	8283,992
130	650,066	9338,143
	649,887	9338,375
	649,977	9363,615

La droite de régression linéaire a été obtenue par la méthode des moindres carrés sous la forme de :

$y = 71,2235x - 54,7829$: équation de linéarité du standard de Flucloxacilline où 71,2235 représente la pente de la droite et - 54,7829 représente l'ordonnée à l'origine, y représente l'aire de pic et x la concentration (figure 7).

$y = 14,3611x + 14,8254$: équation de linéarité de la FP où 14,3611 représente la pente de la droite et 14,8254 représente l'ordonnée à l'origine, y représente l'aire de pic et x la concentration (figure 8).

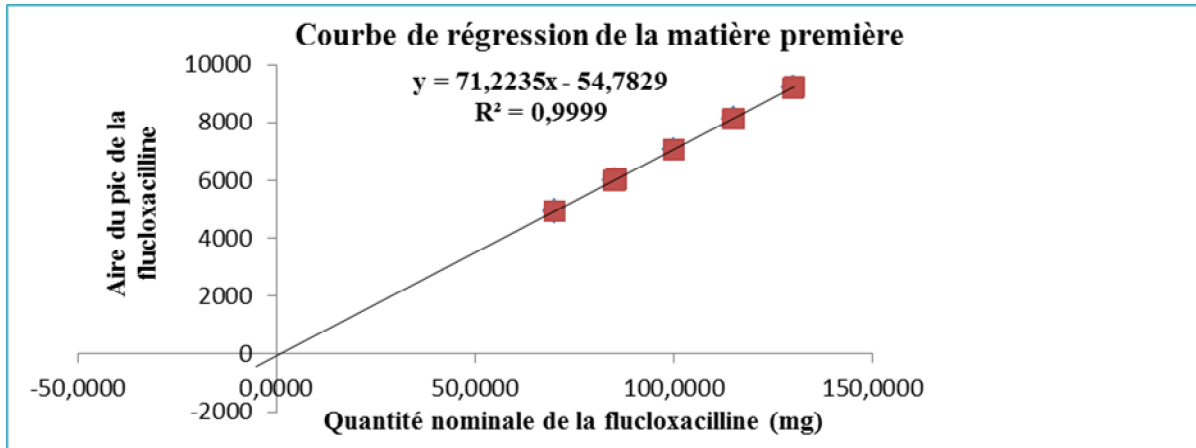


Figure 7- Courbe de régression linéaire du dosage de Flucloxacilline dans la MP

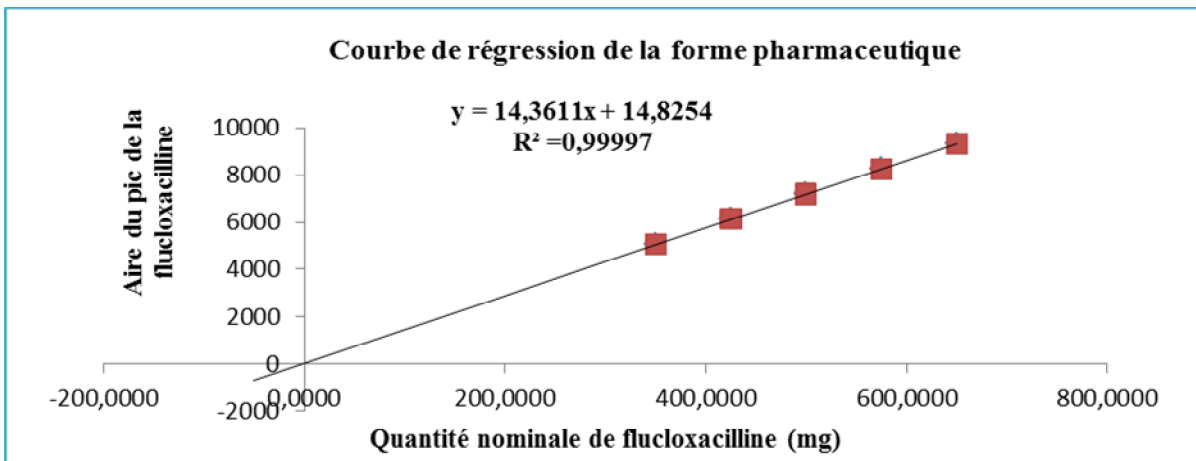


Figure 8- Courbe de régression linéaire du dosage de Flucloxacilline dans la FP

L'analyse des résidus a été effectuée sur chaque point de la régression linéaire (tableau XIII et XIV).

Tableau XIII- Analyse des résidus de linéarité du dosage de Flucloxacilline - MP

Prise d'essai	Réponse prévisionnelle	Réponse réelle	Résidus	Résidus relatifs (%)
1	4930,682	4929,316	-1,366	-0,03
2	4924,165	4908,294	-15,871	-0,32
3	4937,199	4959,254	22,055	0,45
4	6019,013	6009,526	-9,486	-0,16
5	6012,496	6018,116	5,620	0,09
6	5992,945	5999,111	6,166	0,10
7	7068,241	7075,994	7,752	0,11
8	7068,241	7055,766	-12,475	-0,18
9	7068,241	7067,645	-0,596	-0,01
10	8130,504	8110,915	-19,588	-0,24
11	8137,021	8132,451	-4,569	-0,06
12	8137,021	8145,692	8,671	0,11
13	9199,283	9191,897	-7,386	-0,08
14	9218,834	9214,552	-4,281	-0,05
15	9199,283	9224,640	25,356	0,28
				Moyenne = 0,001

Tableau XIV- Analyse des résidus de linéarité du dosage de Flucloxacilline - FP

Prise d'essai	Réponse prévisionnelle	Réponse réelle	Résidus	Résidus relatifs (%)
1	5038,337	5037,820	-0,517	-0,01
2	5040,919	5037,639	-3,279	-0,07
3	5042,210	5036,430	-5,779	-0,11
4	6116,372	6119,591	3,219	0,05
5	6117,663	6114,887	-2,775	-0,05
6	6117,663	6121,005	3,342	0,05
7	7198,279	7190,624	-7,655	-0,11
8	7194,406	7209,308	14,901	0,21
9	7195,697	7202,201	6,503	0,09
10	8269,859	8259,972	-9,886	-0,12
11	8272,441	8275,400	2,959	0,04
12	8277,605	8283,992	6,386	0,08
13	9350,475	9338,143	-12,332	-0,13
14	9347,893	9338,375	-9,517	-0,10
15	9349,184	9363,615	14,430	0,15
				Moyenne = -0,001

La répartition aléatoire des résidus par rapport aux quantités théoriques de Flucloxacilline dans la MP et dans la FP est montrée respectivement dans les graphes des figures 9 et 10.

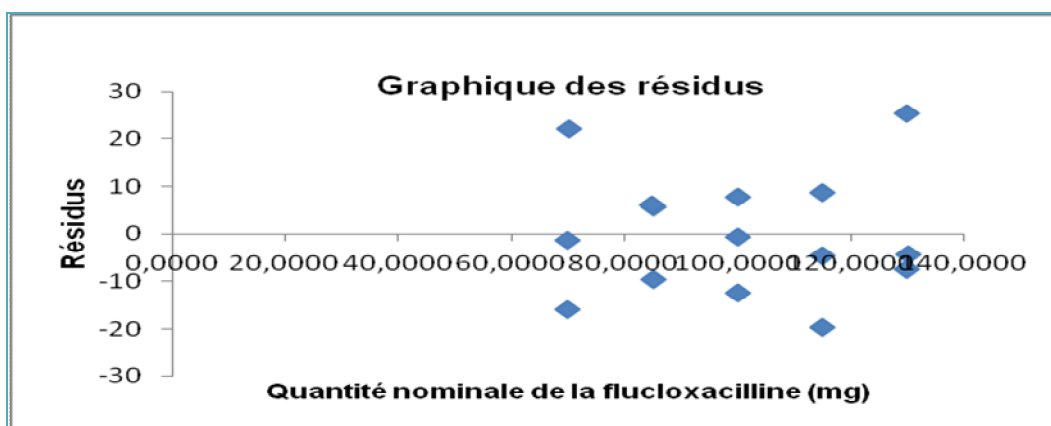


Figure 9- Répartition aléatoire des résidus dans la MP- Dosage

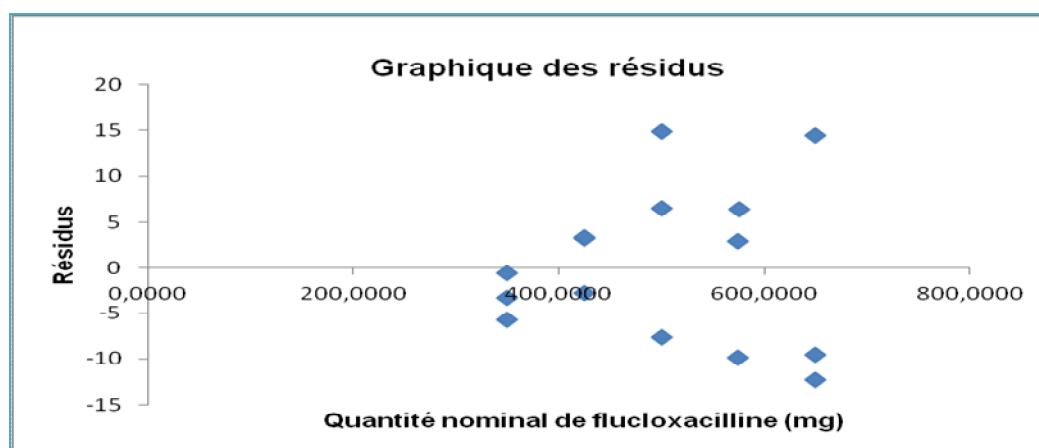


Figure 10- Répartitions aléatoire des résidus dans la FP – Dosage

b- Linéarité de dissolution

La linéarité de dissolution de Flucloxacilline dans la FP a été évaluée à partir de 5 niveaux de concentration (50%, 75%, 100%, 115% et 130%) de la quantité nominale à doser avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau (n=3) et dans un intervalle de confiance de 95% ($p < 0,05$). Les résultats de linéarité de dissolution de Flucloxacilline sont reportés dans le tableau XV.

Tableau XV- Linéarité de la dissolution de Flucloxacilline - FP

% de la cible	Quantité nominale de Flucloxacilline (mg)	Aires des pics
50	250,011	3991,134
	250,191	4002,526
	250,191	3995,289
75	374,972	5982,759
	374,703	5994,425
	374,972	5992,236
100	500,203	7980,089
	500,113	7993,332
	500,203	7985,327
115	575,180	9163,223
	575,270	9194,923
	575,360	9199,954
130	650,246	10346,408
	649,707	10392,588
	650,336	10404,591

La droite de régression linéaire est obtenue par la méthode des moindres carrés sous la forme de : $y = 15,96052 x + 4,701$ où 15,96052 représente la pente de la droite et 4,701 représente l'ordonnée à l'origine, y représente l'aire de pic et x la concentration (figure 11).

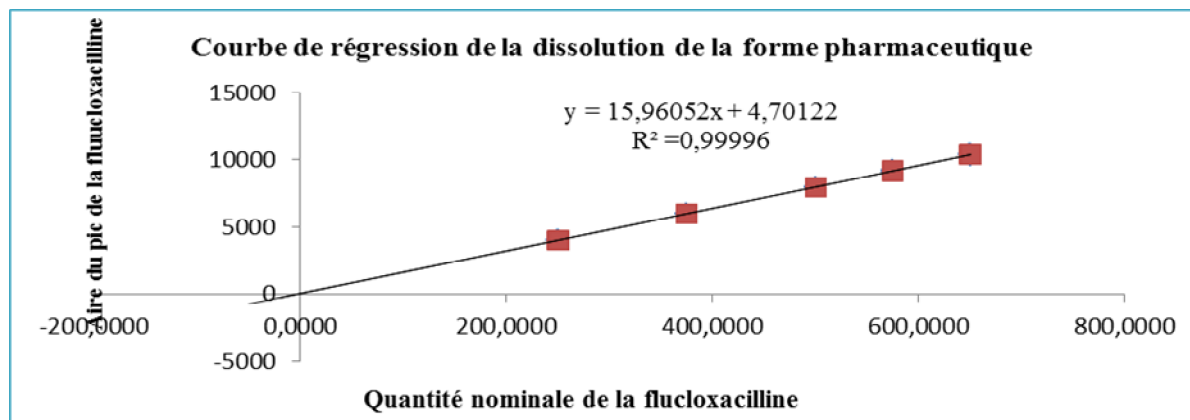


Figure 11- Courbe de régression linéaire de dissolution de Flucloxacilline - FP

L'analyse des résidus de la linéarité de dissolution de Flucloxacilline dans la FP a été effectuée sur chaque point de la régression linéaire (tableau XVI).

Tableau XVI- Analyse des résidus de linéarité de dissolution de Flucloxacilline – FP

Prise d'essai	Réponse prévisionnelle	Réponse réelle	Résidus	Résidus relatifs (%)
1	3995,022	3991,134	-3,888	-0,10
2	3997,892	4002,526	4,634	0,12
3	3997,892	3995,289	-2,602	-0,07
4	5989,465	5982,759	-6,706	-0,11
5	5985,160	5994,425	9,264	0,15
6	5989,465	5992,236	2,770	0,05
7	7988,213	7980,089	-8,123	-0,10
8	7986,778	7993,332	6,554	0,08
9	7988,213	7985,327	-2,886	-0,04
10	9184,879	9163,223	-21,655	-0,24
11	9186,313	9194,923	8,609	0,09
12	9187,748	9199,954	12,205	0,13
13	10382,979	10346,408	-36,571	-0,35
14	10374,370	10392,588	18,218	0,18
15	10384,414	10404,591	20,177	0,19
Moyenne = -0,000				

La répartition aléatoire des résidus par rapport aux quantités théoriques de Flucloxacilline est montrée dans le graphe de la figure 12.

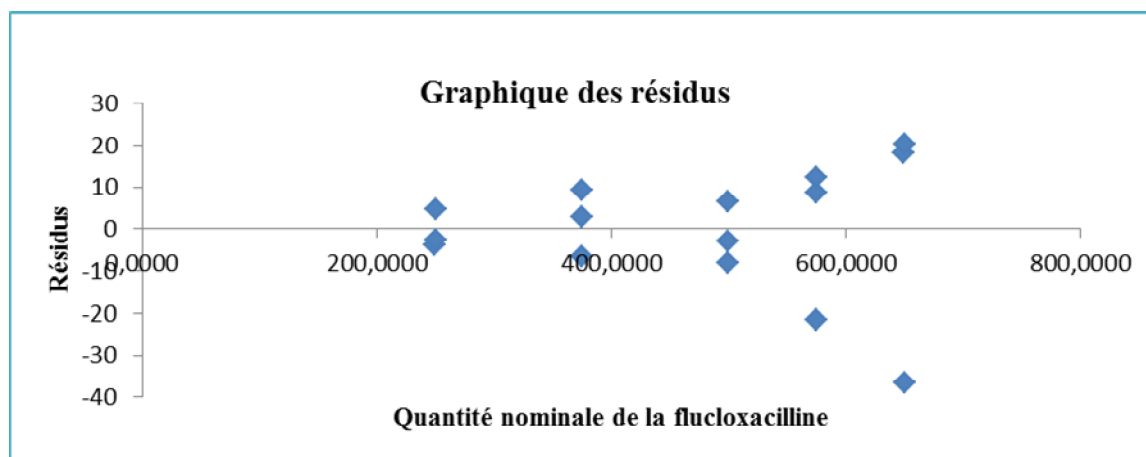


Figure 12- Répartition aléatoire des résidus dans la FP – Dissolution

c- Synthèse des résultats de linéarité du dosage et de dissolution

L'étude de la linéarité de la méthode du dosage de la Flucloxacilline dans la MP :

- Montre une régression linéaire conforme avec une équation de linéarité $y = 71,2235x - 54,7829$, un coefficient de corrélation de 0,9999, une courbe de linéarité qui passe par l'origine.
- Met en évidence une analyse de résidus conforme avec des résidus petits et aléatoires.

Le récapitulatif des résultats de la linéarité du dosage de Flucloxacilline dans la MP est reporté dans le tableau XVII.

Tableau XVII- Récapitulatif des résultats de linéarité du dosage de Flucloxacilline dans la MP

Critère	Résultats	Critères d'acceptation
Pente (mVs(mg/ml)-1)	71,2235	NA
Ordonnée à l'origine	-54,7829	NA
Signification pratique de l'ordonnée à l'origine (%) (*)	0,78%	$\leq 2,0\%$
Signification de F	1,70084E-28	$< 0,05$
Coefficient de corrélation	0,9999	$\geq 0,999$
Analyse des résidus	Résidus petits et aléatoires	Résidus petits et aléatoires

(*) : Pourcentage absolu de l'intercepte par rapport à la réponse prévisionnelle de la concentration cible.

NA : Non applicable

L'étude de la linéarité de la méthode du dosage de la Flucloxacilline dans la FP gélule :

- montre une régression linéaire conforme avec une équation de linéarité $y = 14,3611x + 14,8254$, un coefficient de corrélation de 0,99997, une courbe de linéarité qui passe par l'origine.

- met en évidence une analyse de résidus conforme avec des résidus petits et aléatoires.

Le récapitulatif des résultats de la linéarité du dosage de Flucloxacilline dans la FP est reporté dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII- Récapitulatif des résultats de linéarité du dosage de Flucloxacilline dans la FP

Critère	Résultats	Critères d'acceptation
Pente (mVs(mg/ml)-1)	14,3611	NA
Ordonnée à l'origine	14,8254	NA
Signification pratique de l'ordonnée à l'origine (%)	0,21%	≤ 2,0%
Signification de F	6,31053E-31	< 0,05
Coefficient de corrélation	0,99997	≥ 0,999
Analyse des résidus	Résidus petits et aléatoires	Résidus petits et aléatoires

NA : Non applicable

L'étude de la linéarité de la méthode de dissolution de la Flucloxacilline dans la FP gélule :

- montre une régression linéaire conforme avec une équation de linéarité $y = 15,96052 x + 4,70122$, un coefficient de corrélation de 0,99996, une courbe de linéarité qui passe par l'origine.
- met en évidence une analyse de résidus conforme avec des résidus petits et aléatoires.

Le récapitulatif des résultats de la linéarité de la dissolution de Flucloxacilline dans la FP est reporté dans le tableau XIX.

Tableau XIX- Récapitulatif des résultats de linéarité de dissolution de Flucloxacilline dans la FP

Critère	Résultats	Critères d'acceptation
Pente (mVs(mg/ml)-1)	15,96052	NA
Ordonnée à l'origine	4,70122	NA
Signification pratique de l'ordonnée à l'origine (%)	0,20%	≤ 2,0%
Signification de F	5,11769E-30	< 0,05
Coefficient de corrélation	0,99996	≥ 0,999
Analyse des résidus	Résidus aléatoires et petits	Résidus aléatoires et petits

NA : Non applicable

Au vu des résultats susmentionnés, on conclut que :

- La méthode du dosage de Flucloxacilline dans la MP et dans la FP est linéaire.
- La méthode de dissolution de Flucloxacilline dans la FP est linéaire.

1.1.2. Exactitude du dosage et de dissolution de Flucloxacilline

a- Exactitude du dosage

Elle s'exprime par les pourcentages de recouvrement par rapport à la quantité introduite en principe actif dans les échantillons.

L'analyse de l'exactitude a été effectuée à partir des données et des résultats de l'étude de linéarité correspondant à la méthode du dosage en question.

Les résultats de l'exactitude du dosage de Flucloxacilline dans la MP et dans la FP sont reportés respectivement dans le tableau XX et XXI.

Tableau XX- Exactitude du dosage de Flucloxacilline dans la MP

% de la valeur cible	Quantité nominale de Flucloxacilline (mg)	Quantité trouvée de Flucloxacilline (mg)	% de recouvrement
70	69,997	69,863	99,81
	69,906	69,565	99,51
	70,089	70,287	100,28
85	85,278	85,173	99,88
	85,186	85,294	100,13
	84,912	85,025	100,13
100	100,009	100,288	100,28
	100,009	100,001	99,99
	100,009	100,169	100,16
115	114,924	114,956	100,03
	115,015	115,261	100,21
	115,015	115,448	100,38
130	129,930	130,276	100,27
	130,204	130,597	100,30
	129,930	130,740	100,62
			Moyenne = 100,13
			CV% = 0,26

Tableau XXI- Exactitude du dosage de Flucloxacilline dans la FP

% de la valeur cible	Quantité nominale de Flucloxacilline (mg)	Quantité trouvée de Flucloxacilline (mg)	% de recouvrement
70	349,800	351,740	100,55
	349,980	351,728	100,50
	350,070	351,643	100,45
85	424,867	427,270	100,57
	424,957	426,941	100,47
	424,957	427,368	100,57
100	500,203	502,049	100,37
	499,933	503,354	100,68
	500,023	502,857	100,57
115	574,820	576,711	100,33
	575,000	577,788	100,48
	575,360	578,388	100,53
130	650,066	651,989	100,30
	649,887	652,005	100,33
	649,977	653,767	100,58
			Moyenne = 100,48
			CV% = 0,11

b- Exactitude de dissolution

Les résultats de l'exactitude de la dissolution de Flucloxacilline dans la FP sont reportés dans le tableau XXII.

Tableau XXII- Exactitude de la dissolution de Flucloxacilline dans la FP

% de la valeur cible	Quantité nominale de Flucloxacilline (mg)	Quantité trouvée de Flucloxacilline (mg)	% de recouvrement
50	250,011	251,681	100,67
	250,191	252,399	100,88
	250,191	251,943	100,70
75	374,972	377,273	100,61
	374,703	378,008	100,88
	374,972	377,870	100,77
100	500,203	503,225	100,60
	500,113	504,060	100,79
	500,203	503,555	100,67
115	575,180	577,833	100,46
	575,270	579,832	100,79
	575,360	580,149	100,83
130	650,246	652,445	100,34
	649,707	655,357	100,87
	650,336	656,114	100,89
			Moyenne = 100,72
			CV% = 0,16

c- Synthèse des résultats d'exactitude du dosage et de dissolution

L'étude de l'exactitude du dosage de Flucloxacilline dans la MP a mis en évidence des résultats conformes : Les pourcentages de recouvrement des échantillons analysés sont compris entre 98 et 102% et le CV des pourcentages de recouvrement est de $0,26\% \leq 2\%$

L'étude de l'exactitude du dosage de Flucloxacilline dans la FP a mis en évidence des résultats conformes : les pourcentages de recouvrement des échantillons analysés sont compris entre 98 et 102% et le CV des pourcentages de recouvrement est de $0,11\% \leq 2\%$

L'étude de l'exactitude de la dissolution de Flucloxacilline dans la FP a mis en évidence des résultats conformes : les pourcentages de recouvrement des échantillons analysés sont compris entre 98 et 102% et le CV des pourcentages de recouvrement est de $0,16\% \leq 2\%$.

Au vu des résultats susmentionnés, on conclut que :

- La méthode du dosage de Flucloxacilline dans la MP et dans la FP est exacte.
- La méthode de la dissolution de Flucloxacilline dans la FP est exacte.

1.1.3. Fidélité du dosage et de dissolution de Flucloxacilline dans la FP

La fidélité de la méthode 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 une concentration de 100%.

Le coefficient de variation est déterminé pour un risque de 5 % avec un degré de liberté $ddl = n-1$.

Dans notre cas :

Répétabilité sur 6 échantillons $ddl = 5 \rightarrow t = 2,015$

Fidélité intermédiaire sur 3*6 échantillons $ddl = 3*5=15 \rightarrow t = 1,753$

a- Fidélité du dosage

Les résultats de la fidélité du dosage de Flucloxacilline dans la FP sont reportés dans les tableaux XXIII et XXIV.

Tableau XXIII- Fidélité du dosage de Flucloxacilline dans la FP

	Technicien 1	Technicien 1	Technicien 2		
	série 1	série 2	Série 3		
Essai 1	504,330	504,856	509,387		
Essai 2	503,873	504,347	495,663		
Essai 3	503,951	504,730	505,699		
Essai 4	503,616	505,272	501,252		
Essai 5	504,024	504,257	499,842		
Essai 6	503,827	504,053	500,796		
Moyenne	503,937	504,586	502,106	503,543	Moyenne générale
Variance	0,056	0,203	23,001	7,753	Moyenne des variances
Ecartype	0,238	0,450	4,796	1,653	Variance des moyennes
CV%	0,047	0,089	0,955	9,923	Moyenne des carrés (ANOVA)

Tableau XXIV- Paramètres de fidélité du dosage de Flucloxacilline dans la FP

Paramètres de fidélité	Variance (σ^2)	Ecartype (σ)	CV%
Répétabilité	0,056	0,238	0,047
Répétabilité moyenne	7,753	2,785	0,553
Intergroupe	0,362	NA	NA
Précision intermédiaire	8,115	2,849	0,566

NA : Non applicable

b- Fidélité de dissolution de Flucloxacilline dans la FP

Les résultats de la fidélité de la dissolution de Flucloxacilline dans la FP sont reportés dans le tableau XXV et XXVI.

Tableau XXV- Fidélité de dissolution de Flucloxacilline dans la FP

	Technicien 1 série 1	Technicien 1 série 2	Technicien 2 série 3		
Essai 1	101,737	100,489	100,567		
Essai 2	100,993	100,117	100,164		
Essai 3	100,307	100,183	100,481		
Essai 4	101,004	100,516	99,481		
Essai 5	101,078	100,891	99,063		
Essai 6	102,066	100,569	99,497		
Moyenne	101,197	100,461	99,876	100,511	Moyenne générale
Variance	0,387	0,079	0,377	0,281	Moyenne des variances
Ecartype	0,622	0,282	0,614	0,438	Variance des moyennes
CV%	0,614	0,280	0,615	2,632	Moyenne des carrés (ANOVA)

Tableau XXVI- Paramètres de fidélité de la dissolution de Flucloxacilline dans la FP

Paramètres de fidélité	Variance (σ^2)	Ecartype (σ)	CV%
Répétabilité	0,387	0,622	0,614
Répétabilité moyenne	0,281	0,530	0,527
Intergroupe	0,392	NA	NA
Précision intermédiaire	0,673	0,820	0,816

NA : Non applicable

c- Synthèse des résultats de fidélité du dosage et de dissolution

L'étude de la fidélité du dosage de Flucloxacilline dans la FP a mis en évidence des résultats conformes :

- Pour la répétabilité (n=6), le CV est de $0,047\% \leq 2\%$
- Pour la répétabilité moyenne (n=12), le CV est de $0,553\% \leq 2\%$
- Pour la fidélité intermédiaire (n=18), le CV est de $0,566\% \leq 2\%$

L'étude de la fidélité de dissolution de Flucloxacilline dans la FP a mis en évidence des résultats conformes :

- Pour la répétabilité (n=6), le CV est de 0,614%
- Pour la répétabilité moyenne (n=12), le CV est de 0,527%
- Pour la fidélité intermédiaire (n=18), le CV est de 0,816%

Au vu des résultats susmentionnés, on conclut que la méthode du dosage et de dissolution de Flucloxacilline dans la FP est fidèle.

1.1.4. Spécificité du dosage de Flucloxacilline

Pour étudier la spécificité du dosage de Flucloxacilline dans la FP, on a analysé une prise d'essai de chacun des échantillons cités ci-dessous :

- Blanc : eau purifiée dont le chromatogramme est illustré dans la figure 13.
- Placebo 1 : stéarate de magnésium dont le chromatogramme est illustré dans la figure 14.
- Témoin : Flucloxacilline dont le chromatogramme est illustré dans la figure 15.
- Essai reconstitué de la FP dont le chromatogramme est illustré dans la figure 16.

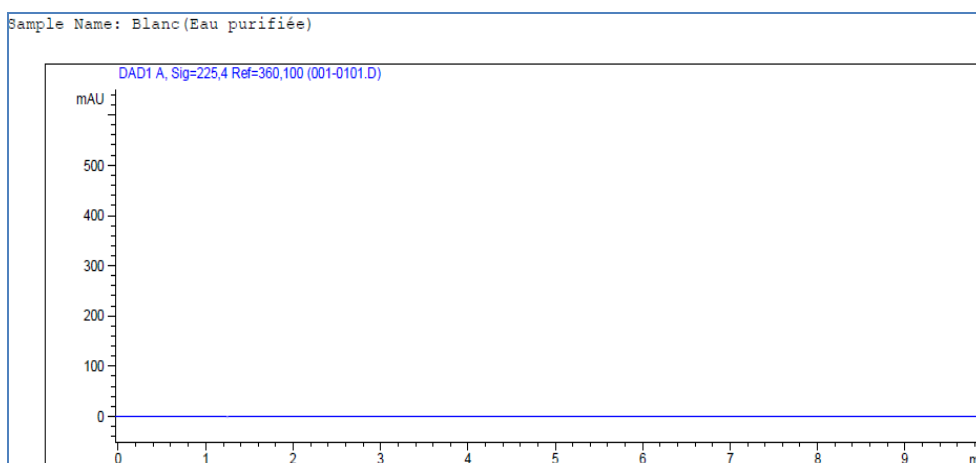


Figure 13- Chromatogramme du blanc – dosage

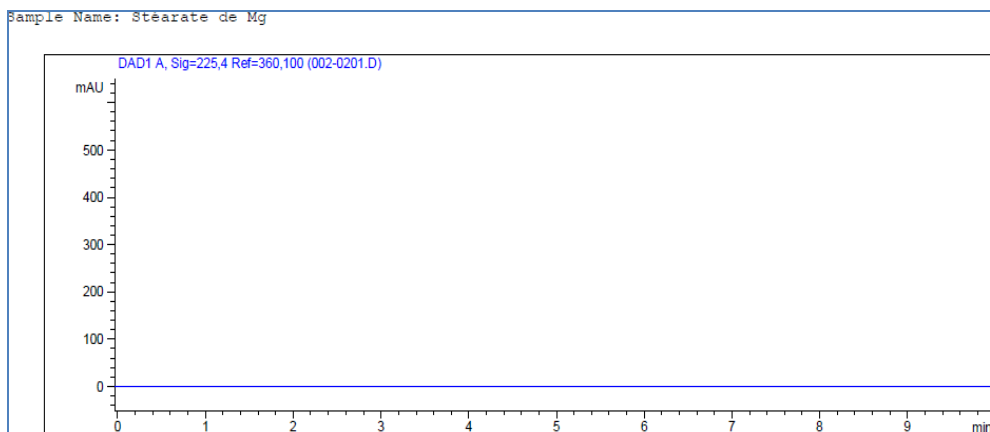


Figure 14- Chromatogramme du placebo 1

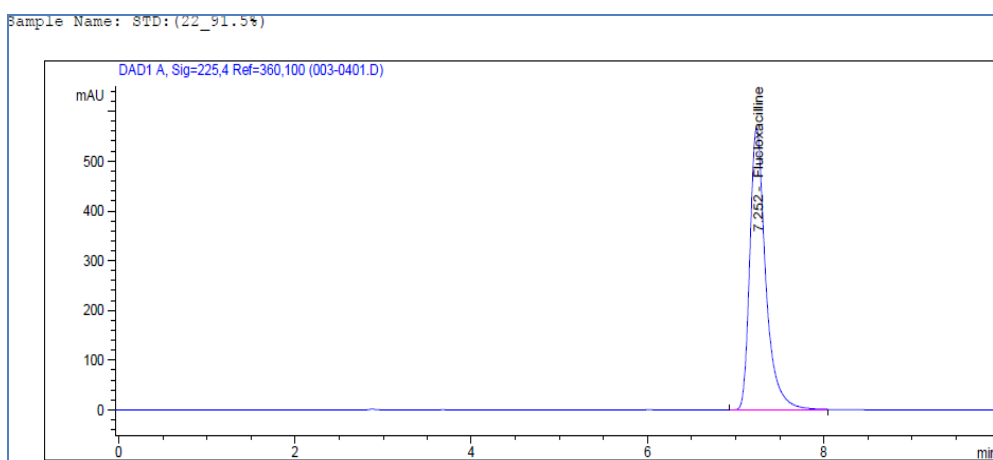


Figure 15- Chromatogramme du témoin de Flucloxacilline

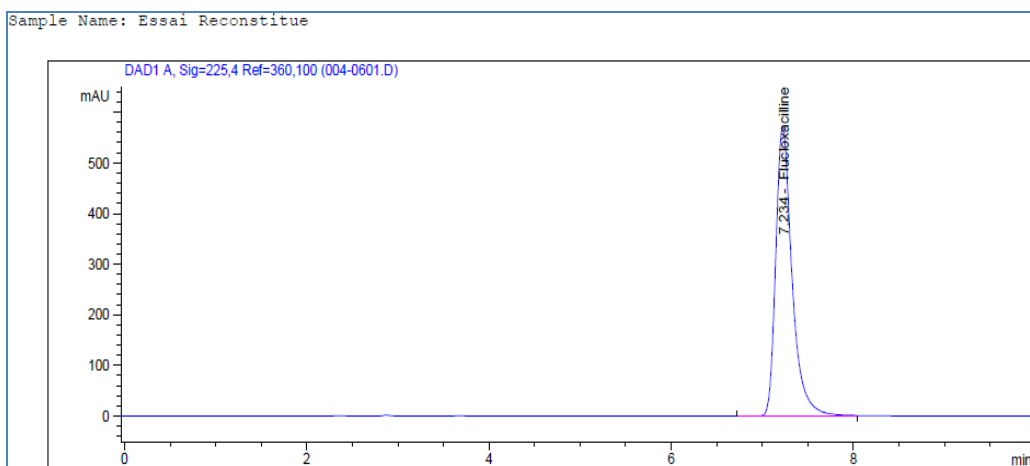


Figure 16- Chromatogramme de l'essai reconstitué de la FP

Les figures 17 et 18 présentent respectivement les puretés des pics du témoin et de l'essai reconstitué de la FP.

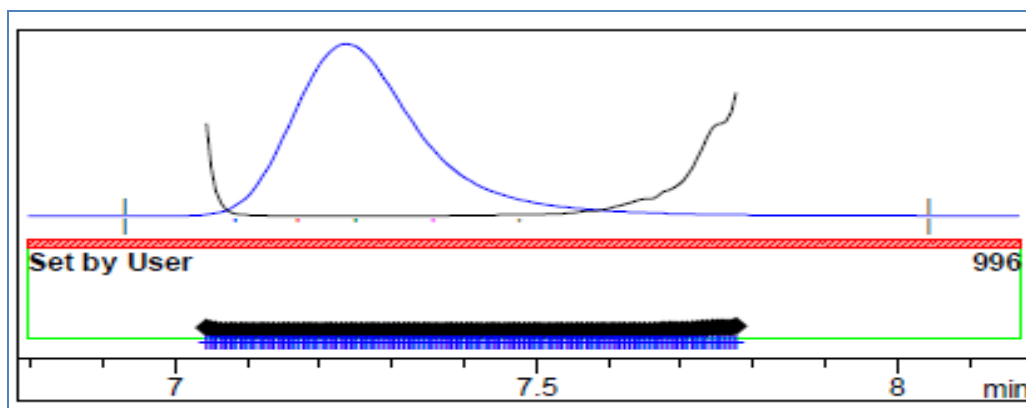


Figure 17- Pureté du pic du témoin de Flucloxacilline

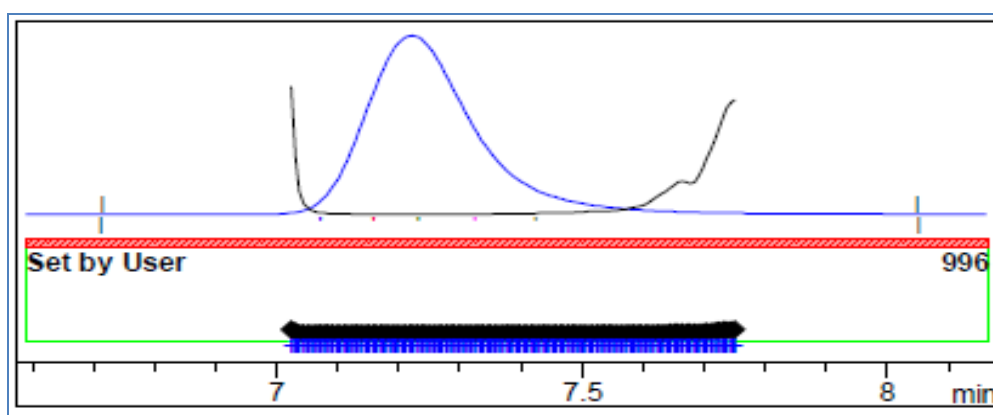


Figure 18- Pureté du pic de l'essai reconstitué de la FP

a- Synthèse des résultats de spécificité du dosage

Le jugement de la conformité de l'étude de spécificité se base sur les critères suivants :

- Ratio pureté du pic de Flucloxacilline doit être ≥ 996 %
- Le temps de rétention de Flucloxacilline dans la FP doit être comparable à celui du témoin.
- Pas d'interférence entre le Flucloxacilline et l'excipient.

Les résultats de spécificité sont reportés dans le tableau XXVII.

Tableau XXVII- Récapitulatif des résultats de spécificité du dosage de Flucloxacilline

Solution	Temps de rétention (min)	Ratio Pureté (%)
Stéarate de magnésium	Non détecté	Non applicable
Témoin	7,25	999,979
Essai gélules	7,23	999,981
Normes	Comparable T _r Témoin	≥ 996

Tr : Temps de rétention

On conclut que la méthode du dosage de Flucloxacilline dans les gélules est spécifique au vu des points suivants :

- Le chromatogramme du témoin montre un pic pur, résolu et bien intégré avec un temps de rétention de 7,25 min.
- Le chromatogramme de la FP gélule montre un pic pur, résolu et bien intégré avec un temps de rétention de 7,23 min qui est comparable à celui du témoin.
- Le chromatogramme du stéarate de magnésium de la FP reconstituée ne met en évidence aucun pic.

1.2. Validation de la méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline

Les substances apparentées recherchées dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélule » sont les suivantes : impureté A, impureté B, impureté C, impureté D et impureté E.

1.2.1. Linéarité de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline

La linéarité du dosage du standard de Flucloxacilline à 1% dans la MP et dans la FP a été évaluée à partir de 5 niveaux de concentration (50%, 70%, 85%, 100% et 120%) de la quantité nominale à doser avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau (n=3) et dans un intervalle de confiance de 95% ($p < 0,05$).

Les résultats de linéarité du standard de Flucloxacilline à 1% dans la MP et dans la FP sont reportés respectivement dans le tableau XXVIII et XXIX.

Tableau XXVIII- Linéarité du dosage du standard de Flucloxacilline à 1%

% de la cible	Quantité nominale de Flucloxacilline (mg)	Aires des pics
50	9,882	49,722
	9,973	49,102
	10,065	50,330
70	13,908	69,250
	13,816	67,591
	13,999	70,364
85	16,836	83,715
	16,744	83,881
	17,293	86,113
100	20,038	100,382
	20,038	99,918
	20,038	99,879
120	24,064	119,996
	24,156	121,309
	24,064	120,937

Tableau XXIX- Linéarité du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP

% de la cible	Quantité nominale de Flucloxacilline(mg)	Aires des pics
50	10,158	50,024
	9,889	47,197
	10,158	50,123
70	14,204	68,896
	14,114	69,494
	14,114	69,161
85	16,901	83,600
	16,991	83,218
	16,901	84,687
100	19,957	98,990
	19,957	98,591
	19,957	99,776
120	24,093	119,496
	24,003	118,030
	24,093	118,831

La droite de régression linéaire est obtenue par la méthode des moindres carrés sous la forme de :

$y = 5,0343x - 0,7227$: équation de linéarité du standard de Flucloxacilline à 1% où 5,0343 représente la pente de la droite, et $- 0,7227$ représente l'ordonnée à l'origine, y représente l'aire de pic et x la concentration (figure 19).

$y = 5,0037 x - 1,2206$: équation de linéarité du standard de Flucloxacilline à 1% dans la FP où 5,0037 représente la pente de la droite, et $- 1,2206$ représente l'ordonnée à l'origine, y représente l'aire de pic et x la concentration (figure 20).

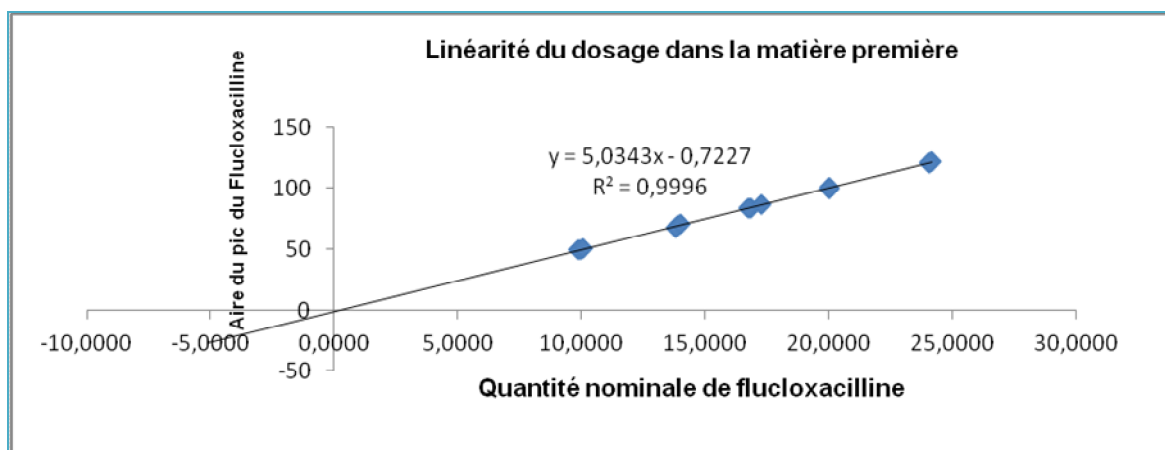


Figure 19- Courbe de régression linéaire du standard de Flucloxacilline à 1% - MP

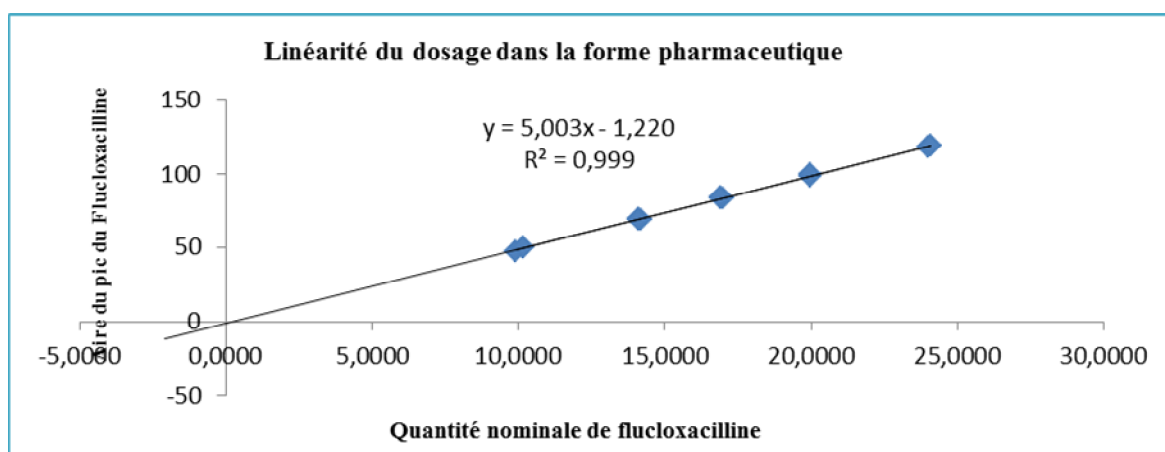


Figure 20- Courbe de régression linéaire de du standard Flucloxacilline à 1% - FP

L'analyse des résidus de linéarité du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la MP a été effectuée sur chaque point de la régression linéaire (tableau XXX et XXXI).

Tableau XXX- Analyse des résidus de linéarité du dosage du standard de Flucloxacilline à 1% -

MP

Prise d'essai	Réponse prévisionnelle	Réponse réelle	Résidus	Résidus relatifs (%)
1	49,026	49,722	0,696	1,42
2	49,486	49,102	-0,383	-0,78
3	49,947	50,330	0,382	0,77
4	69,294	69,250	-0,043	-0,06
5	68,833	67,591	-1,242	-1,81
6	69,754	70,364	0,609	0,87
7	84,034	83,715	-0,318	-0,38
8	83,573	83,881	0,307	0,37
9	86,337	86,113	-0,223	-0,26
10	100,156	100,382	0,225	0,23
11	100,156	99,918	-0,238	-0,24
12	100,156	99,879	-0,277	-0,28
13	120,424	119,996	-0,428	-0,36
14	120,885	121,309	0,423	0,35
15	120,424	120,937	0,512	0,43
				Moyenne = 0,02

Tableau XXXI- Analyse des résidus de linéarité du dosage de Flucloxacilline 1% - FP

Prise d'essai	Réponse prévisionnelle	Réponse réelle	Résidus	Résidus relatifs (%)
1	49,610	50,024	0,413	0,83
2	48,261	47,197	-1,063	-2,20
3	49,610	50,123	0,512	1,03
4	69,853	68,896	-0,956	-1,37
5	69,403	69,494	0,091	0,13
6	69,403	69,161	-0,242	-0,35
7	83,348	83,600	0,252	0,30
8	83,798	83,218	-0,579	-0,69
9	83,348	84,687	1,338	1,61
10	98,642	98,990	0,348	0,35
11	98,642	98,591	-0,050	-0,05
12	98,642	99,776	1,133	1,15
13	119,335	119,496	0,161	0,14
14	118,885	118,030	-0,855	-0,72
15	119,335	118,831	-0,504	-0,42
				Moyenne = 0,02

La répartition aléatoire des résidus par rapport aux quantités théoriques de Flucloxacilline à 1% dans la MP et dans la FP est montrée respectivement dans les graphes des figures 21 et 22.

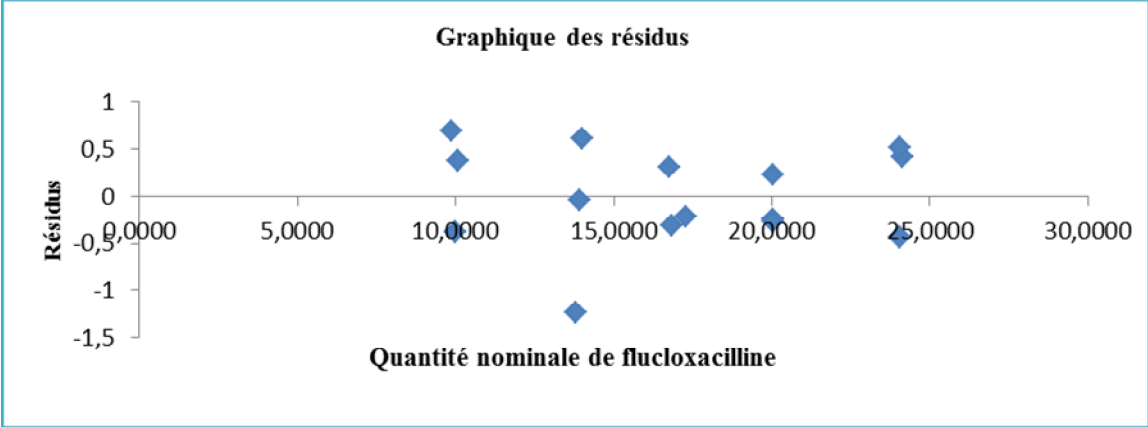


Figure 21- Répartition aléatoire des résidus de Flucloxacilline à 1% - Substances apparentées

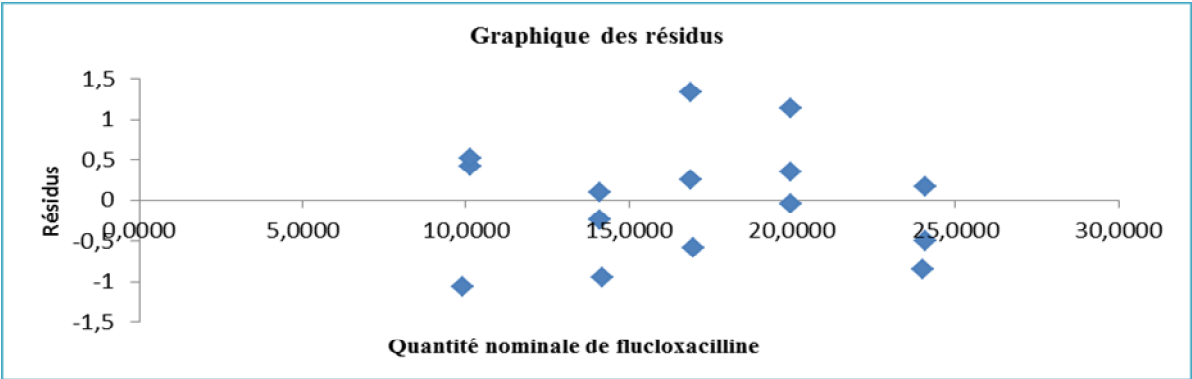


Figure 22- Répartition aléatoire des résidus de Flucloxacilline à 1% dans la FP – Substances apparentées

a. Synthèse des résultats de linéarité de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline

L'étude de la linéarité de la méthode du dosage du standard de Flucloxacilline à 1% :

- montre une régression linéaire conforme avec une équation de linéarité $y = 5,0343x - 0,7227$, un coefficient de corrélation de 0,9996, une courbe de linéarité qui passe par l'origine.
- met en évidence une analyse de résidus conforme avec des résidus petits et aléatoires.

L'étude de la linéarité de la méthode du dosage de la Flucloxacilline à 1% dans la FP gélule :

- montre une régression linéaire conforme avec une équation de linéarité $y = 5,0037x - 1,2206$, un coefficient de corrélation de 0,9992, une courbe de linéarité qui passe par l'origine.
- met en évidence une analyse de résidus conforme avec des résidus petits et aléatoires.

Les récapitulatifs des résultats de linéarité du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la MP et dans la FP sont présentés respectivement dans les tableaux XXXII et XXXIII.

Tableau XXXII- Récapitulatif des résultats du dosage du standard de Flucloxacilline à 1%

Critère	Résultats	Critères d'acceptation
Pente (mVs(mg/ml)-1)	5,0343	NA
Ordonnée à l'origine	-0,7227	NA
Signification pratique de l'ordonnée à l'origine (%)	0,72	≤ 20%
Coefficient de corrélation	0,9996	≥ 0.995
Analyse des résidus	Résidus aléatoires et petits	Résidus aléatoires et petits

NA : Non applicable

Tableau XXXIII- Récapitulatif des résultats du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP

Critère	Résultats	Critères d'acceptation
Pente (mVs(mg/ml)-1)	5,0037	NA
Ordonnée à l'origine	-1,2206	NA
Signification pratique de l'ordonnée à l'origine (%)	1,24	$\leq 20\%$
Coefficient de corrélation	0,9992	$\geq 0,995$
Analyse des résidus	Résidus aléatoires et petits	Résidus aléatoires et petits

NA : Non applicable

Au vu des résultats susmentionnés, on conclut que la méthode du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la MP et dans la FP est linéaire.

1.2.2. Exactitude de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline

Elle s'exprime par les pourcentages de recouvrement par rapport à la quantité introduite en principe actif dans les échantillons.

L'analyse de l'exactitude a été effectuée à partir des données et des résultats de l'étude de linéarité correspondant à la méthode du dosage en question.

Les résultats de l'exactitude du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la MP et la FP sont reportés respectivement dans les tableaux XXXIV et XXXV.

Tableau XXXIV- Exactitude du dosage du standard de Flucloxacilline à 1% dans la MP

% de la valeur cible	Quantité nominale de Flucloxacilline (mg)	Quantité trouvée de Flucloxacilline (mg)	% de recouvrement
50	9,882	9,962	100,82%
	9,973	9,838	98,65%
	10,065	10,084	100,19%
70	13,908	13,875	99,77%
	13,816	13,542	98,02%
	13,999	14,098	100,71%
85	16,836	16,773	99,63%
	16,744	16,807	100,37%
	17,293	17,254	99,77%
100	20,038	20,113	100,37%
	20,038	20,020	99,91%
	20,038	20,012	99,87%
120	24,064	24,043	99,91%
	24,156	24,306	100,62%
	24,064	24,231	100,70%
			Moyenne= 99,95
			CV% =0,77

Tableau XXXV- Exactitude du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP

% de la valeur cible	Quantité nominale de Flucloxacilline (mg)	Quantité trouvée de Flucloxacilline (mg)	% de recouvrement
50	10,158	10,024	98,68
	9,889	9,458	95,64
	10,158	10,044	98,87
70	14,204	13,806	97,20
	14,114	13,926	98,67
	14,114	13,859	98,19
85	16,901	16,752	99,12
	16,991	16,676	98,15
	16,901	16,970	100,41
100	19,957	19,836	99,39
	19,957	19,756	98,99
	19,957	19,994	100,18
120	24,093	23,946	99,39
	24,003	23,652	98,54
	24,093	23,812	98,84
			Moyenne = 98,68
			CV% = 1,17

a. Synthèse des résultats d'exactitude de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline

L'étude de l'exactitude du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la MP met en évidence des résultats conformes : les pourcentages de recouvrement des échantillons analysés sont compris entre 98,0% et 102,0% et le CV des pourcentages de recouvrement est de $0,77\% \leq 2\%$.

L'étude de l'exactitude du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP met en évidence des résultats conformes : les pourcentages de recouvrement des échantillons analysés sont compris entre 98,0% et 102,0% et le CV des pourcentages de recouvrement est de $1,17\% \leq 2\%$.

Au vu des résultats susmentionnés, on conclut que :

- La méthode du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la MP est exacte.
- La méthode du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP est exacte.

1.2.3. Fidélité de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline

La fidélité de la méthode de recherche des substances apparentées 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 une concentration de 100%.

Le CV est déterminé pour un risque de 5 % avec un degré de liberté $ddl = n-1$.

Dans notre cas :

Répétabilité sur 6 échantillons $ddl = 5 \rightarrow t = 2,015$

Fidélité intermédiaire sur 3*6 échantillons $ddl = 3*5=15 \rightarrow t = 1,753$

Les résultats de la fidélité du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP sont reportés dans le tableau XXXVI.

Tableau XXXVI- Fidélité du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP

	Analyste 1	Analyste 2	Analyste 3	
Essai 1	19,837	19,843	19,530	
Essai 2	19,757	19,790	19,588	
Essai 3	19,994	19,825	19,544	
Essai 4	19,614	19,779	19,727	
Essai 5	19,774	19,969	19,745	
Essai 6	19,594	19,611	19,750	
Moyenne	19,762	19,803	19,647	19,737 Moyenne générale
Variance	0,022	0,013	0,011	0,015 Moyenne des variances
Ecartype	0,148	0,116	0,104	0,006 Variance des moyennes
CV%	0,751	0,585	0,531	0,038 Moyenne des carrés (ANOVA)

Paramètres de fidélité	Variance (σ^2)	Ecartype (σ)	CV%
Répétabilité	0,022	0,148	0,751
Répétabilité moyenne	0,015	0,124	0,629
Intergroupe	0,004	NA	NA
Précision intermédiaire	0,019	0,139	0,705

Le jugement de la conformité de l'étude de fidélité se base sur les critères suivants :

Les CV de la répétabilité, de la répétabilité moyenne et de la fidélité intermédiaire sont inférieurs à 2%.

a. Synthèse des résultats de fidélité de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline

L'étude de fidélité du dosage de Flucloxacilline à 1% dans la FP met en évidence des résultats conformes :

- Pour la répétabilité (n=6), le CV est de 0,751%
- Pour la répétabilité moyenne (n=12), le CV est de 0,629%
- Pour la fidélité intermédiaire (n=18), le CV est de 0,705%

Au vu des données susmentionnées, on conclut que la méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline à 1% dans la FP est fidèle.

1.2.4. Spécificité de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline

Pour étudier la spécificité de la recherche des substances apparentées de Flucloxacilline dans la FP, on a analysé une prise d'essai de chacun des échantillons cités ci-dessous :

- Blanc : tampon pH 6,8 dont le chromatogramme est illustré dans la figure 23.
- Placebo : Stéarate de magnésium dont le chromatogramme est illustré dans la figure 24.
- Témoin : Flucloxacilline sodique 1% dont le chromatogramme est illustré dans la figure 25.
- Solutions témoins des impuretés de Flucloxacilline sodique impureté A, impureté B, impureté C, impureté D ET impureté E dont les chromatogrammes sont illustrés respectivement dans les figures 26, 27, 28, 29 et 30.
- Essai synthétique 1 : Impureté A, B, C, D auxquelles est ajouté le stéarate de magnésium dont le chromatogramme est illustré dans la figure 31.
- Essai synthétique 2 : Impureté E à laquelle est ajouté le stéarate de magnésium dont le chromatogramme est illustré dans la figure 32.

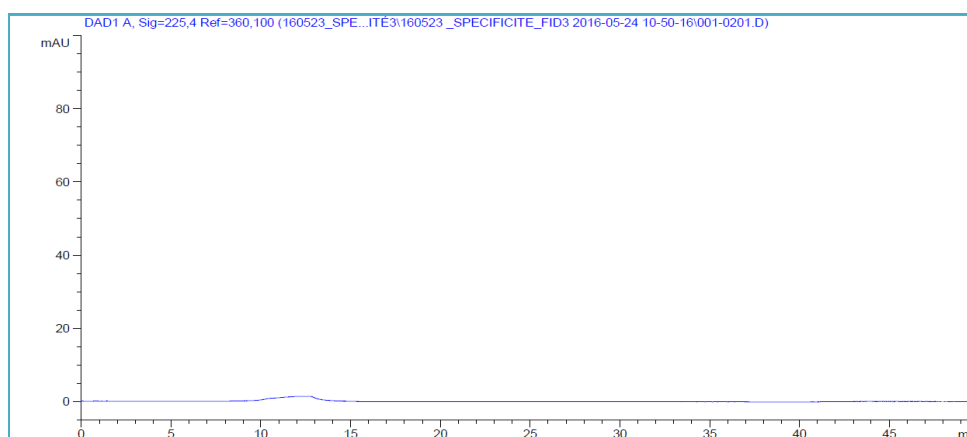


Figure 23- Chromatogramme du blanc- Substances apparentées

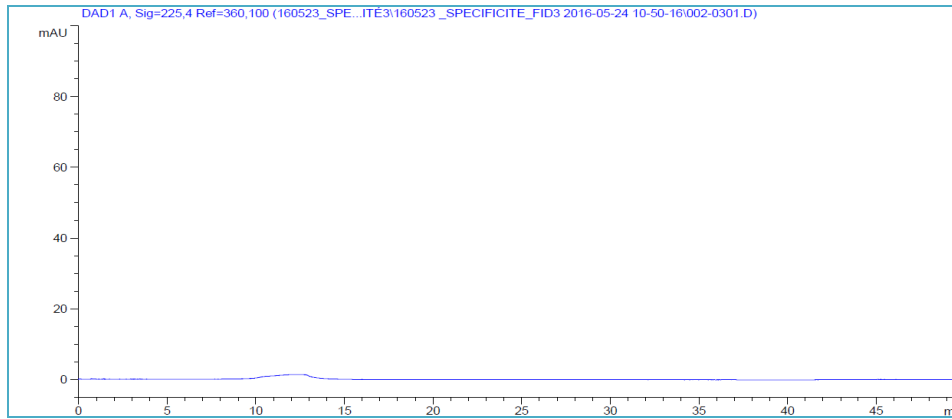


Figure 24- Chromatogramme du placebo 2

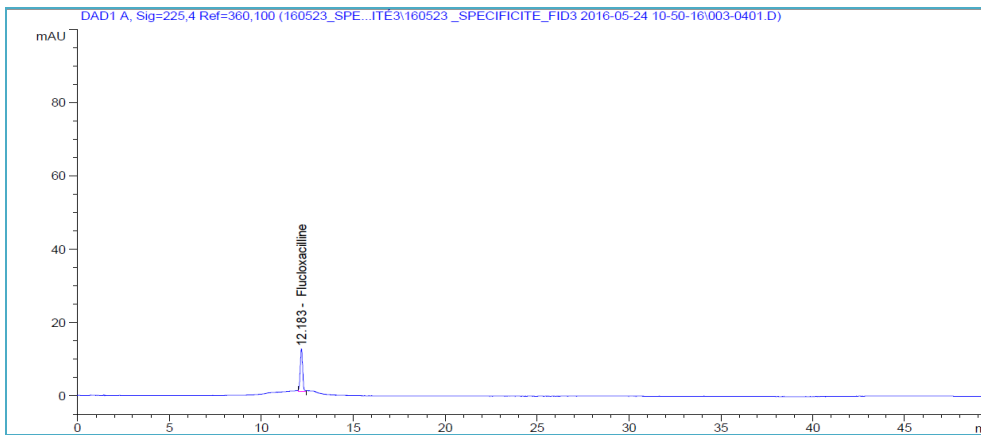


Figure 25- Chromatogramme du témoin Flucloxaciline à 1%

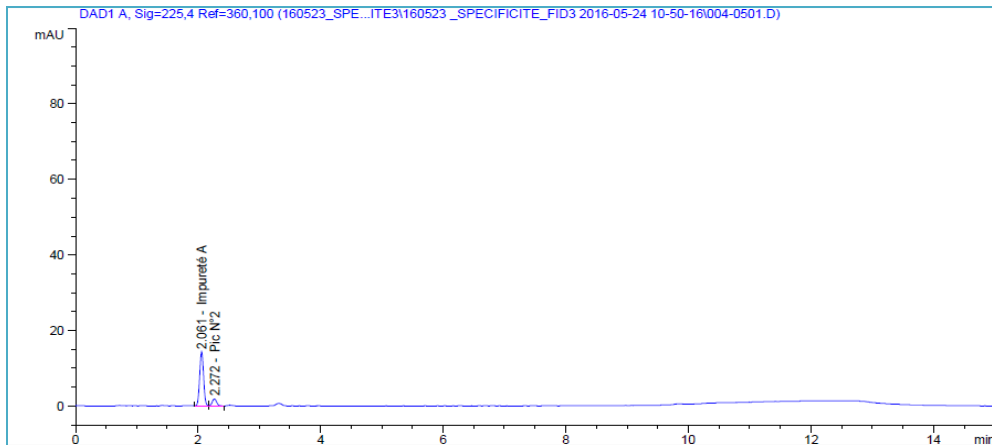


Figure 26- Chromatogramme du témoin Impureté A

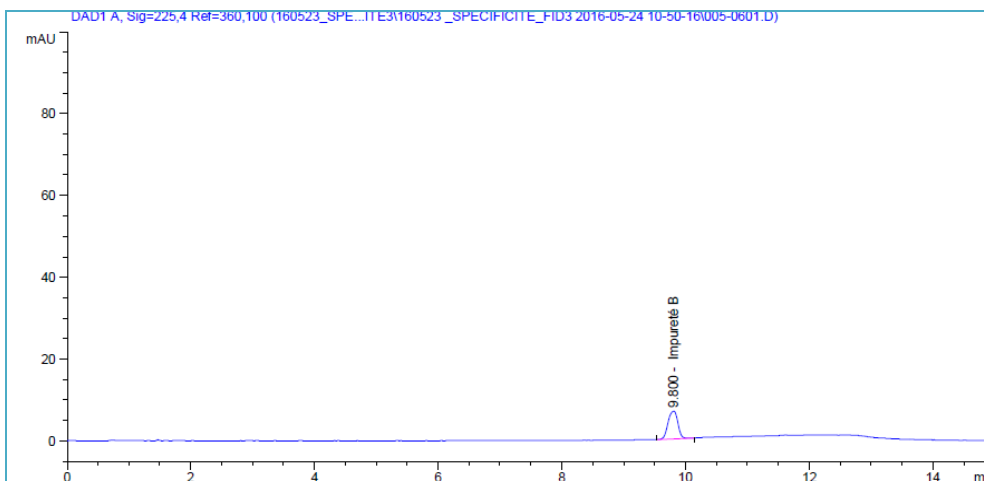


Figure 27- Chromatogramme du témoin Impureté B

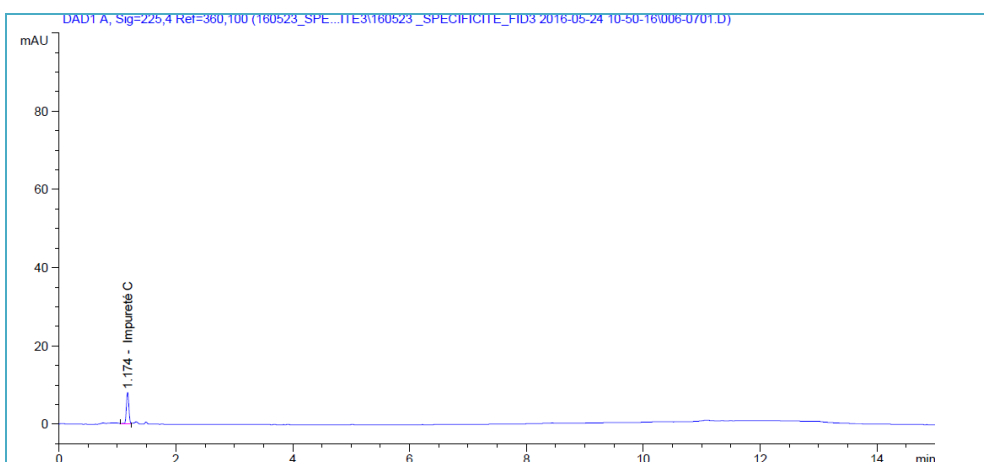


Figure 28- Chromatogramme du témoin Impureté C

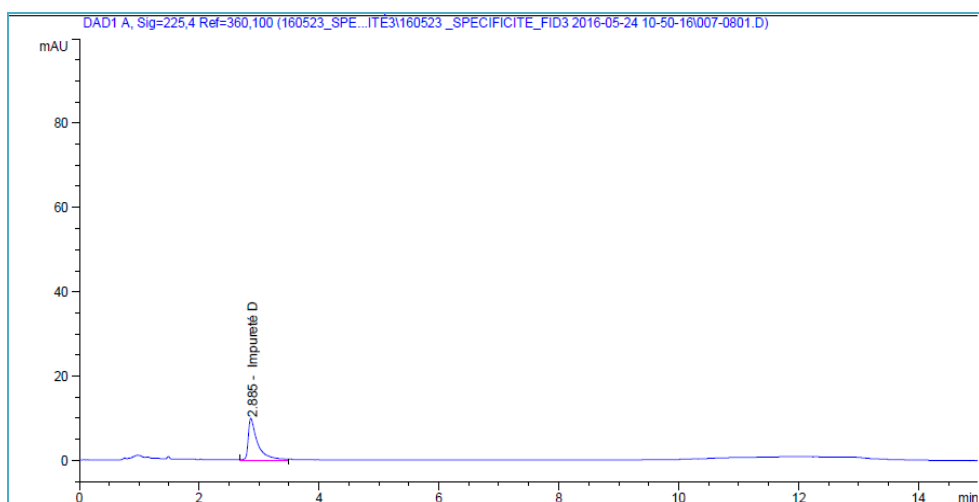


Figure 29- Chromatogramme du témoin Impureté D

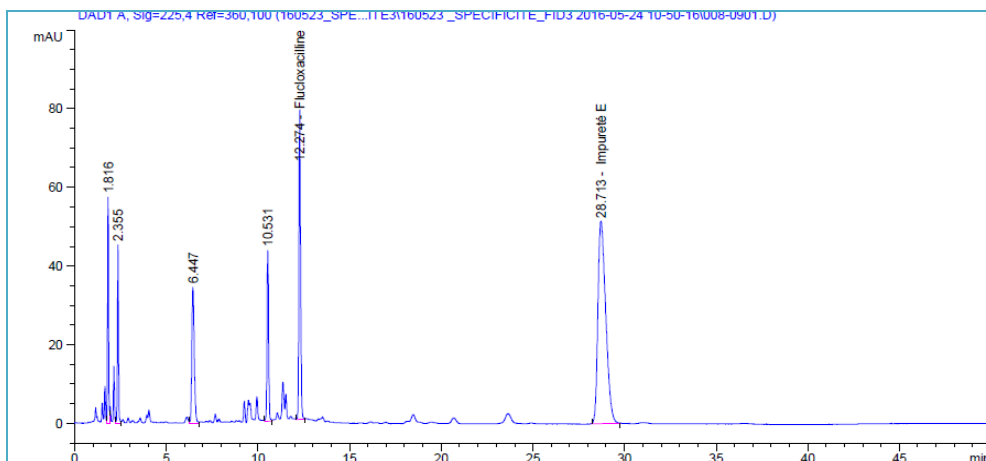


Figure 30- Chromatogramme du témoin Impureté E

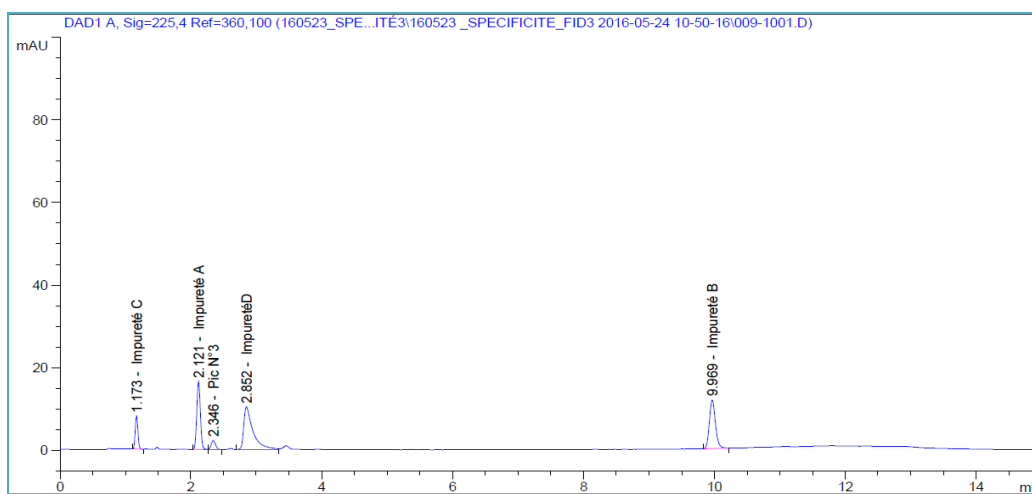


Figure 31- Chromatogramme de l'essai synthétique 1

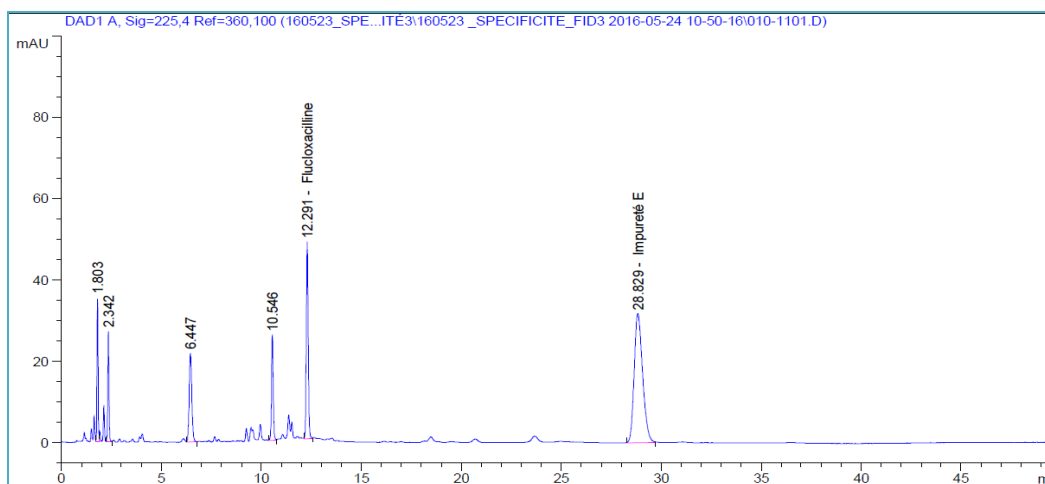


Figure 32- Chromatogramme de l'essai synthétique 2

Les figures 33, 34, 35, 36, 37, 38 présentent respectivement les puretés des pics des témoins de : Flucloxacilline à 1%, impureté A, impureté B, impureté C, impureté D, impureté E.

Les figures 39, 40, 41, 42, 43 présentent respectivement les puretés des pics des impuretés A, B, C et D de l'essai synthétique 1, et de l'impureté E de l'essai synthétique 2.

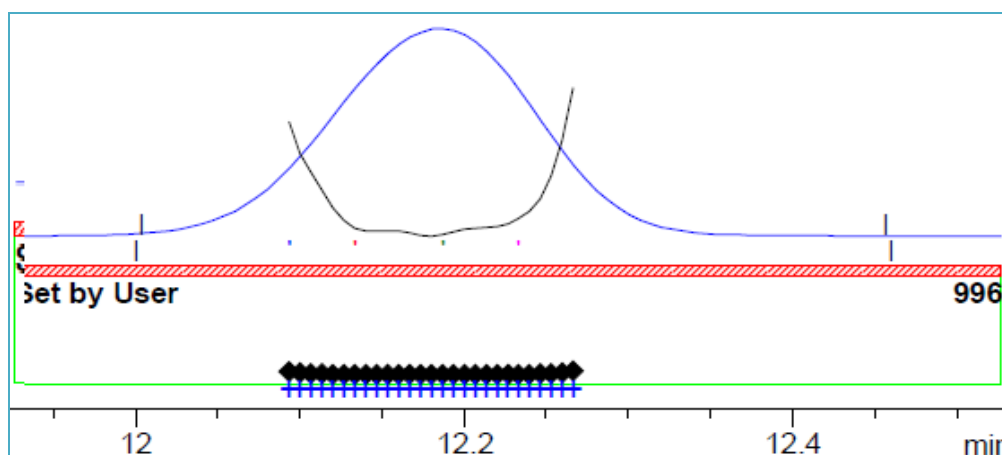


Figure 33- Ratio pureté du témoin Flucloxacilline à 1%

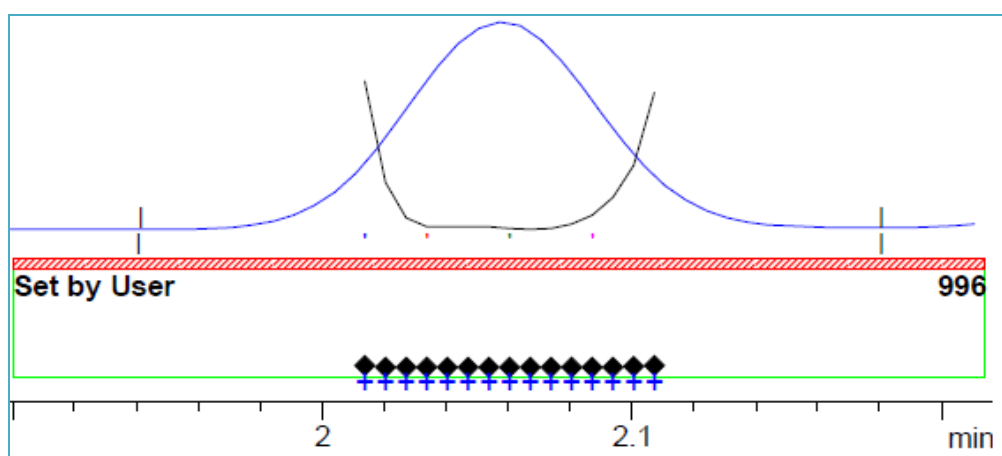


Figure 34- Ratio pureté du témoin Impureté A

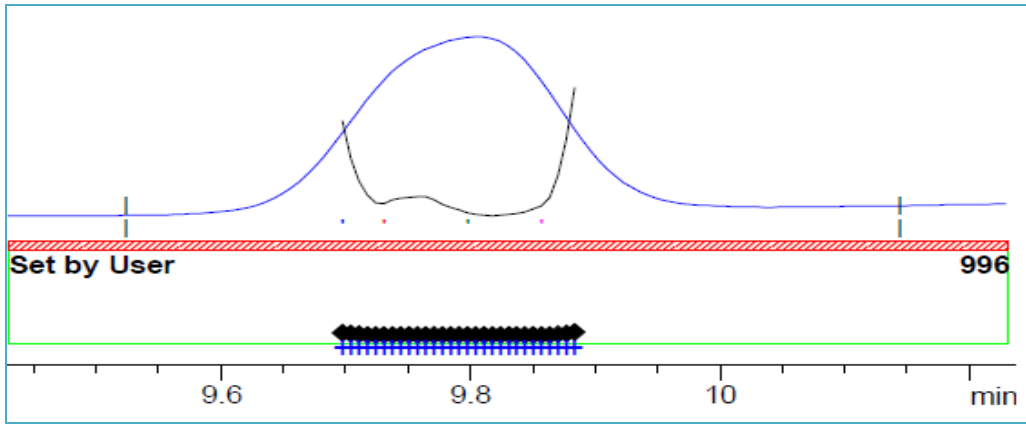


Figure 35- Ratio pureté du témoin Impureté B

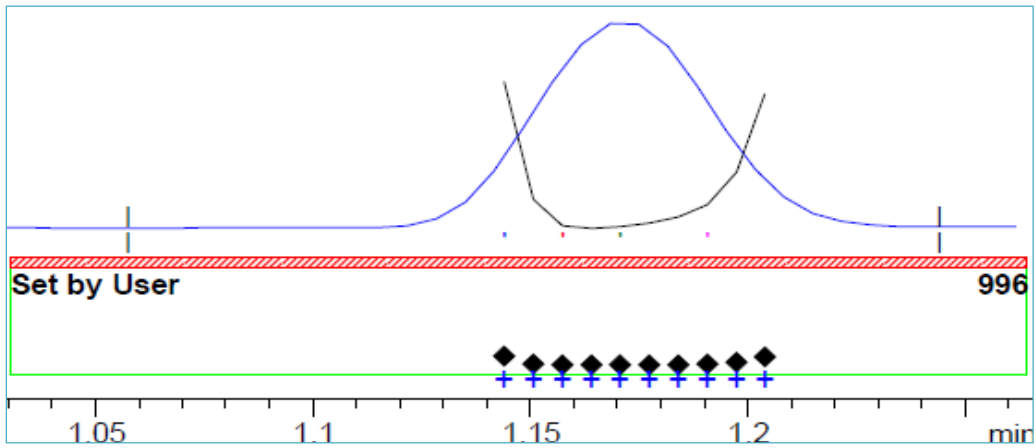


Figure 36- Ratio pureté du témoin Impureté C

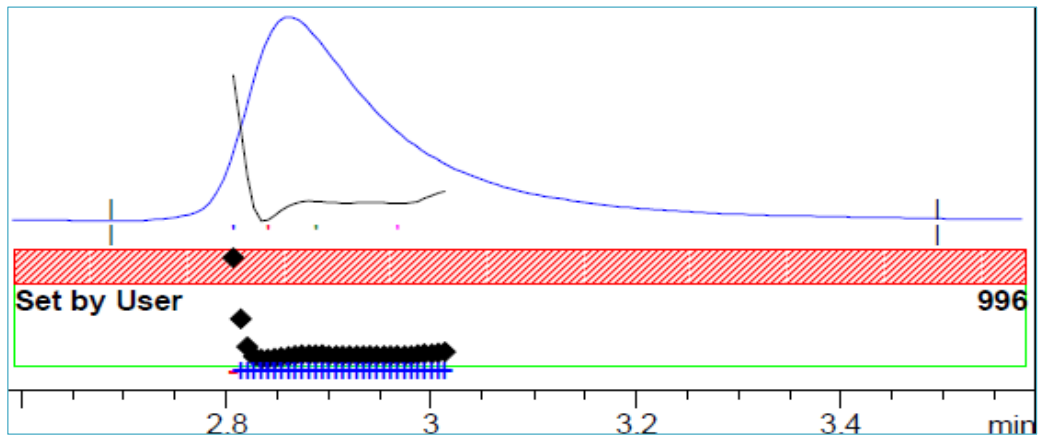


Figure 37- Ratio pureté du témoin Impureté D

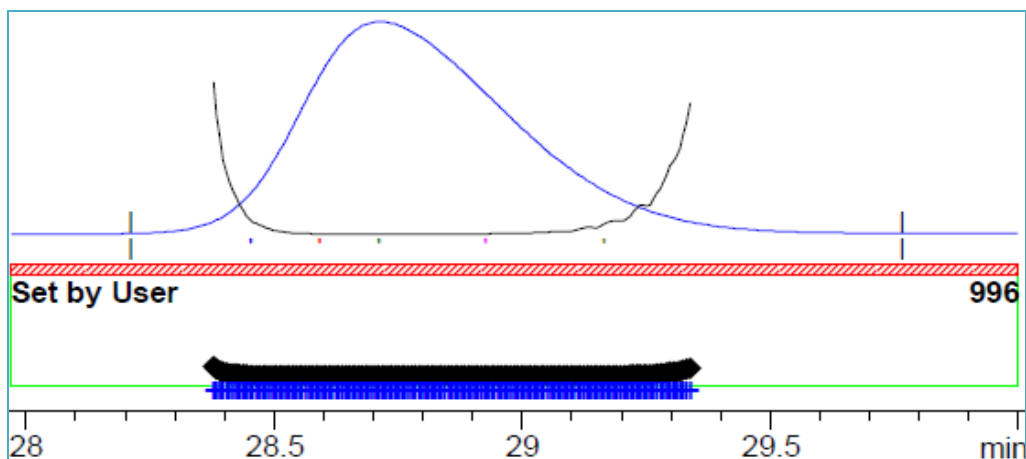


Figure 38- Ratio pureté du témoin Impureté E

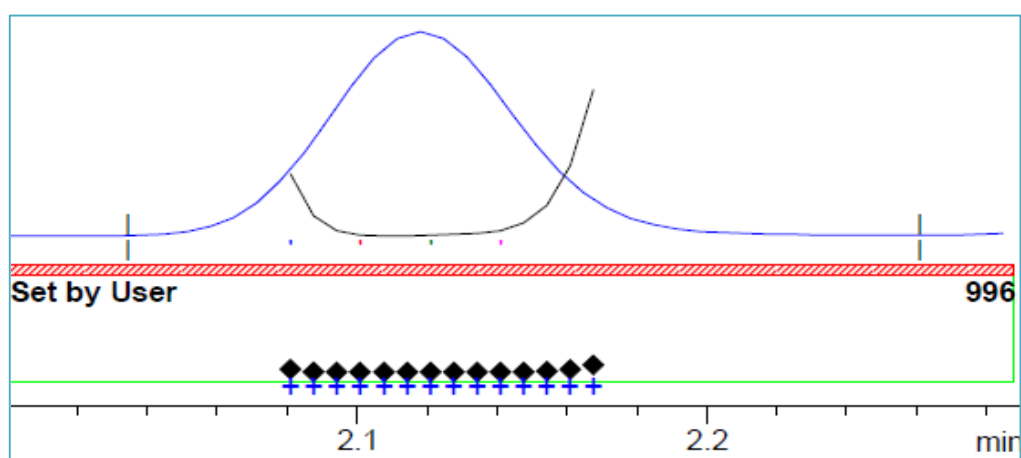


Figure 39- Ratio pureté de l'impureté A de l'essai synthétique 1

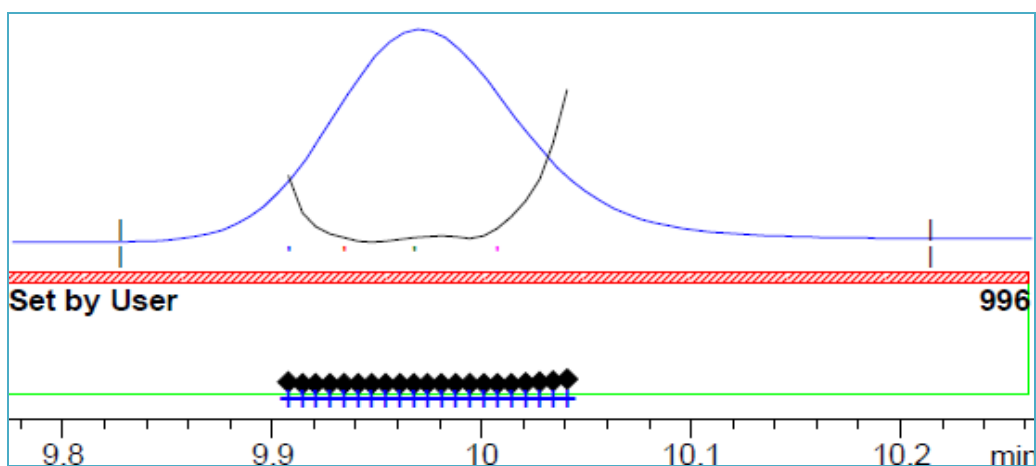


Figure 40- Ratio pureté de l'impureté B de l'essai synthétique 1

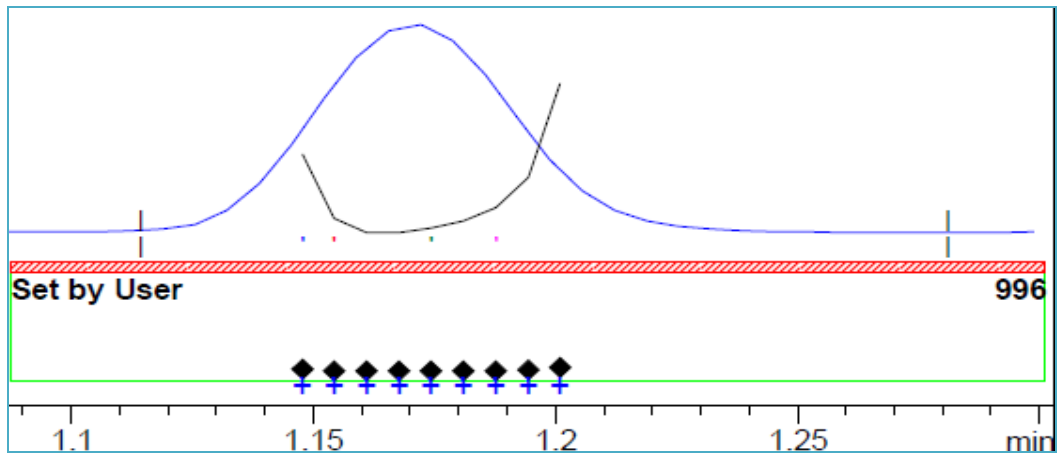


Figure 41- Ratio pureté de l'impureté C de l'essai synthétique 1

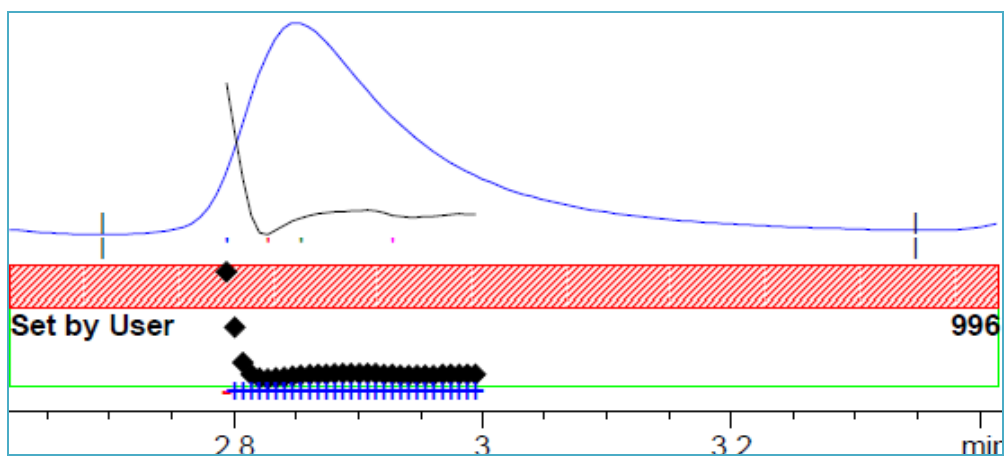


Figure 42- Ratio pureté de l'impureté D de l'essai synthétique 1

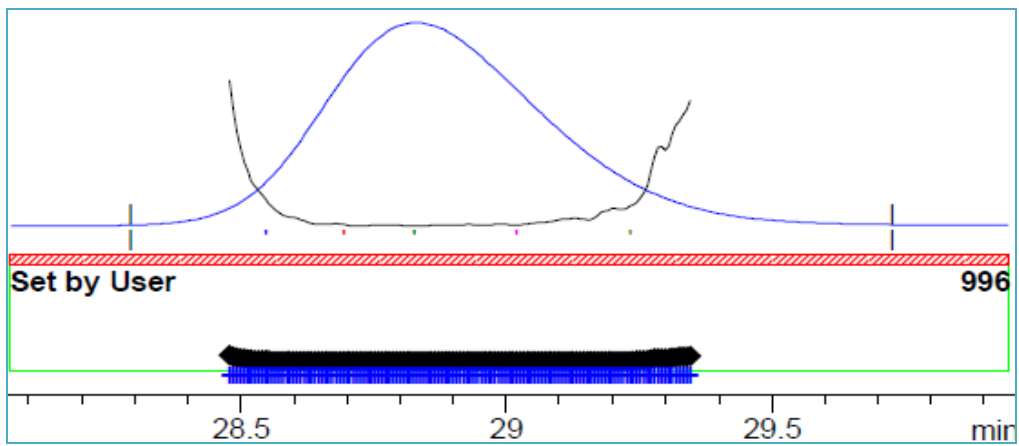


Figure 43- Ratio pureté de l'impureté E de l'essai synthétique 2

Le jugement de la conformité de l'étude de spécificité se base sur les critères suivants :

- Ratio pureté du pic de Flucloxacilline doit être ≥ 996
- Le temps de rétention de chacun des témoins des impuretés A, B, C, D et E doit être comparable à celui des impuretés A, B, C, D et E des essais synthétiques.
- Pas d'interférence entre le Flucloxacilline et les impuretés.

Les résultats de spécificité sont reportés dans le tableau XXXVII.

Tableau XXXVII- Récapitulatif des résultats de spécificité de la méthode de recherche des substances apparentées dans la FP

	Temps de rétention (min)	Résolution	Ratio Pureté (‰)
Excipient			
Stéarate de magnésium	NA	NA	NA
Témoin			
Flucloxacilline sodique 1%	12,2	NA	999,960
Impureté A	2,1	1,68	999,973
Impureté B	9,8	NA	999,942
Impureté C	1,2	NA	999,891
Impureté D	2,9	NA	999,707
Impureté E	28,7	34,66	999,969
Essai synthétique			
Impureté A	2,1	2,12	999,951
Impureté B	10	36,71	999,961
Impureté C	1,2	10,5	999,959
Impureté D	2,9	3,1	999,662
Impureté E	28,8	35,47	999,967
Normes	$\sim T_r$ Témoin	$\geq 1,2$	≥ 996

NA : Non applicable

Ratio pureté :

a. Synthèse des résultats de spécificité de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline

La méthode du dosage des substances apparentées de Flucloxacilline à 1% dans la FP est spécifique au vu des points suivants :

- Le chromatogramme du témoin Flucloxacilline sodique montre un pic pur, résolu et bien intégré avec un temps de rétention de 12,2 min.
- Les chromatogrammes des impuretés de Flucloxacilline sodique des solutions synthétiques 1 et 2 montrent des pics résolus et bien intégrés avec des temps de rétention comparables à ceux des impuretés de la solution témoin.

Le chromatogramme de stéarate de magnésium ne met en évidence aucun pic aux temps de rétentions obtenus pour les impuretés de la solution témoin et pour les solutions synthétiques.

1.2.5. Limite de détection et limite de quantification

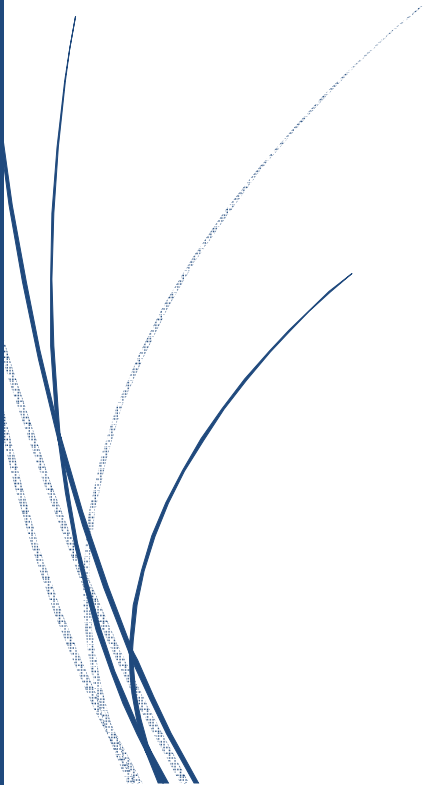
L'approche de l'écart-type de la réponse et de la pente de la courbe d'étalonnage a été adoptée dans notre étude pour la détermination de la limite de détection (LD) et de la limite de quantification (LQ).

Ainsi, le calcul de la (LD) et de la (LQ) a été effectué à partir des données de la linéarité de la solution témoin de Flucloxacilline à 1%.

La LD et la LQ étaient respectivement 35,2 et 106,8 ng/ml.



IV- DISCUSSION



1. Méthodes conventionnelles d'analyse de la Flucloxacilline sodique

Dans la présente étude, on a utilisé la technique HPLC pour le développement et la validation de deux méthodes analytiques conformément aux lignes directrices de l'ICH Q2(R1) :

- méthode de dosage et de dissolution de Flucloxacilline sodique dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélulé »
- méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique dans le même produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélulé »

Dans la littérature, plusieurs techniques analytiques sont utilisées pour le dosage de la Flucloxacilline dans les formes pharmaceutiques ou dans les fluides corporels comme la potentiométrie (27), la polarographie (28), la spectrophotométrie (29), (30), (31), (32), (33), la chromatographie liquide à haute performance (3), (4), (34). En outre, la littérature présente des méthodes analytiques de quantification de la Flucloxacilline associée à d'autres molécules pénicilliniqes dans différentes formes pharmaceutiques (35), (36), (37), (38), (39).

La plupart de ces techniques sont coûteuses ou difficiles à développer comparées aux méthodes HPLC.

1.1. Méthodes Spectrophotométriques

Des méthodes spectrophotométriques aux ultraviolets visibles sont rapportées dans la littérature pour l'analyse de la Flucloxacilline seul ou en mélange avec l'amoxicilline en utilisant le NaOH à 0,1 N comme solvant (29), (30).

Autres méthodes spectrophotométriques peuvent utiliser des composés comme le réactif 1,2,4-triazole avec le chlorure de mercure (II) pour la dérivation de la Flucloxacilline afin de rendre l'analyse possible, les composés de dérivation utilisés sont coûteux et la procédure implique le chauffage qui peut prendre beaucoup de temps (31).

De plus, la littérature rapporte des méthodes spectrophotométriques avec transfert de charge pour l'analyse de la Flucloxacilline. L'interaction charge-transfert se fait entre la

Flucloxacilline en tant que donneur d'électrons et l'acide chloranilique, le dichloroquinone 4-chloroimid en tant qu'accepteurs d'électrons (32).

Une méthode spectrophotométrique a été développée pour la détermination de certains médicaments antibiotiques comme l'Ampicilline, la Dicloxacilline, la Flucloxacilline et l'Amoxicilline. Le procédé implique la formation de paires d'ions entre ces médicaments et le complexe inorganique de Mo (V) -thiocyanate suivi de son extraction avec du chlorure de méthylène (33).

1.2. Méthodes chromatographiques liquides à haute performance

Au Maroc, on remarque une non disponibilité des études publiées de validation analytique pour le screening de la Flucloxacilline dans les formulations pharmaceutiques ou dans les fluides corporels. Or, une validation analytique d'une méthode simultanée de dosage et de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline dans un produit semi fini a été réalisée au niveau du Laboratoire Contrôle Qualité du site Saham Pharma en Novembre 2016, en effet la méthode a été développée et validée conformément à la monographie de la Flucloxacilline sodique de la Pharmacopée Européenne en vigueur. Les résultats issus de cette étude ont été transcrits dans un rapport de validation analytique : document interne approuvé par l'Assurance Qualité du site Saham Pharma (40). Suite au consentement du Pharmacien Responsable Saham Pharma, on a pu tirer profit de quelques données analytiques et d'y reporter dans ce présent travail.

A l'échelle internationale, et plus récemment la plupart des dosages de Flucloxacilline, seuls ou en combinaison avec d'autres médicaments dans des formulations pharmaceutiques et des fluides corporels, ont été effectués avec l'utilisation de l'HPLC. En effet, La Flucloxacilline a été testée dans le plasma sanguin en utilisant la dicloxacilline comme étalon interne et l'acétonitrile comme composant de la phase mobile (3), (34). Plusieurs autres méthodes HPLC validées emploient l'acétonitrile comme composant de leurs phases mobiles (4), (35), (36), (37), (38). Par ailleurs, l'acétonitrile est plus coûteux par rapport à la plupart des solvants organiques et ne peut pas faciliter l'analyse de routine dans un établissement pauvre. La littérature rapporte également des méthodes HPLC pour l'analyse de la Flucloxacilline et de ses produits de dégradation (39).

1.2.1. Comparaison des conditions chromatographiques appliquées pour l'analyse de Flucloxacilline par HPLC par différentes études

Dans notre étude, les conditions chromatographiques utilisées pour la validation analytique de dosage et de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélule » sont reportées respectivement dans les tableaux III et IV.

Le tableau XXVIII présente les conditions chromatographiques choisies dans différentes études de validation.

Tableau XXXVIII- Conditions chromatographiques appliquées pour l'analyse de Flucloxacilline par HPLC par différentes études

Etudes	Conditions chromatographiques				
	Type de colonne	Longueur d'onde (nm)	Débit (ml/min)	Volume d'injection (µl)	Phase mobile
Dosage et recherche substances apparentées (40)	Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R (250 cm × 4 mm, 5 µm)	225	1	20	Mélange tampon phosphate pH 5,0 et acétonitrile (75 V : 25 V)
Dosage (4)	Phenomenex® Bondclone 10 C18 (300 × 3,9 mm, 5µm)	225	1	100	Mélange tampon phosphate pH 5,0 et méthanol (40 V : 60 V)
Dosage (35)	Waters C18 (30 × 4,6 mm, 2,5 µm)	210	1	25	Mélange tampon phosphate pH 3,0 et acétonitrile (60:40)
Dosage (36)	LUNA®, SCX, (250 x 4,6 mm, 5µm)	254	1	20	Mélange tampon phosphate à pH 7,0 et acétonitrile (90:10)
Dosage (37)	Kromasil® C18 (250 cm × 4,6 mm, 5µm)	225	1,5	20	Mélange tampon phosphate 0.020M et acétonitrile (75:25)
Dosage (38)	ZORBAX® 300-SCX (250 × 4,6 mm, 5 µm)	225	1,5	10	Mélange tampon phosphate pH 2,6 et acétonitrile (95:5)
Dosage et recherche des substances apparentées (39)	Phenomenex® Resolve C18 (300 × 3,9mm, 5µm)	220 et 240	1	20	Mélange tampon pH 5,0 (*) et acétonitrile (19:81)

Amox : Amoxicilline

(*) : Tampon constitué de 20 mM de dihydrogénophosphate de potassium plus 10 mM de chlorure de tétraméthylammonium dans de l'eau

1.2.2. Synthèse

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une méthode rapide, répandue et présente l'avantage d'être utilisée en l'identification et la quantification de plusieurs composés en même temps. En revanche son utilisation nécessite un savoir-faire technique et des retraitements des données.

Il est donc très important qu'une méthode très précise, rapide, fiable et peu coûteuse soit développée et validée pour permettre une analyse très fréquente de la Flucloxacilline sodique dans les formes pharmaceutiques solides.

2. Points forts et limites de l'étude

2.1. Points forts

La méthode du dosage et celle de la recherche des substances apparentées de Flucloxacilline dans la FP gélule sont développées et validées selon les lignes directrices de l'ICH Q2(R1). Elles sont par ailleurs optimisées, simples, spécifiques, précises, exactes et peuvent être appliquées en routine pour le screening de Flucloxacilline dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélule ».

2.2. Limites

2.2.1. Manque des données bibliographiques au niveau national pour le screening de la flucloxacilline

Au Maroc, on remarque une non disponibilité d'études publiées sur le thème de la validation analytique du principe actif « Flucloxacilline ».

Par ailleurs, peu d'études ont abordé la validation analytique des méthodes de screening des substances médicamenteuses dans leurs formes pharmaceutiques ou dans les liquides corporels au niveau national, les principales études réalisées dans ce sens sont citées ci-dessous.

La littérature rapporte une méthode de détermination de l'Azithromycine par chromatographie sur couche mince de haute performance dans deux produits pharmaceutiques: Zithromax® et Azimycine®, la méthode proposée a été développée et

validée selon la méthodologie de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP92) et selon les lignes directrices de l'ICH Q2(R1) (41).

La littérature rapporte également une méthode de détermination simultanée du butylhydroxyanisole et de la Simvastatine avec ses impuretés dans les comprimés par chromatographie liquide haute performance couplée au détecteur à photodiode, la méthode proposée a été développée et validée selon les lignes directrices de l'ICH Q2(R1) (42).

Une méthode spectrophotométrique UV-vis de quantification du Diclofénac sodique a été abordée par la littérature, la méthode analytique en question destinée au screening du Diclofénac soit dans des spécialités pharmaceutiques soit dans des matrices supposées contaminées par ce type de médicament a été développée et validée selon la méthodologie de la SFSTP92 et selon les lignes directrices de l'ICH Q2(R1) (43).

En outre, une méthode électrochimique a été développée et validée selon les lignes directrices de l'ICH Q2(R1) pour le screening de l'Ibuprofène dans des échantillons de sang humain (44).

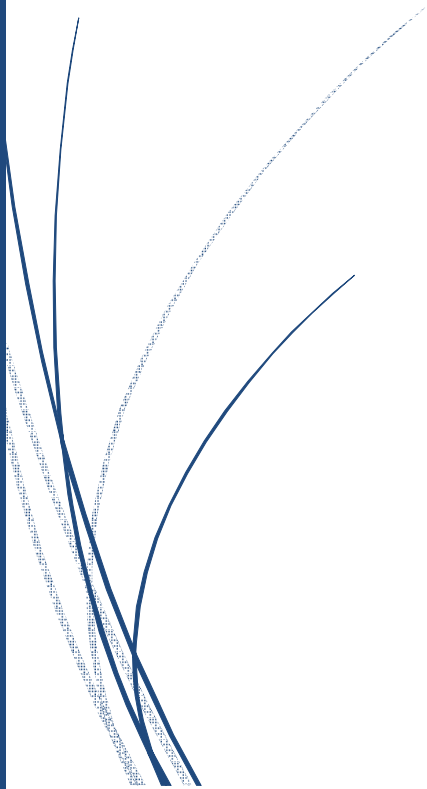
2.2.2. Non évaluation de la robustesse dans la présente étude

Selon les lignes directrices de l'ICH Q2(R1), la robustesse est l'un des paramètres à vérifier dans une validation analytique (tableau I).

Dans la présente étude, la robustesse n'a pas été évaluée, cette dernière permet de définir les variations admissibles de chacun des paramètres opératoires critiques qui sont sans effet sur la validité des résultats fournis.



CONCLUSION



On s'est intéressé dans le présent travail au développement et à la validation d'une méthode de dosage et de dissolution d'un antibiotique « Flucloxacilline 500 mg gélule » et d'une méthode de recherche des substances apparentées du même produit par chromatographie liquide haute performance à polarité de phase inversée couplée à un détecteur à barrette de diodes. Dans la première partie, nous avons déterminé les paramètres optimaux permettant l'analyse de Flucloxacilline pour la validation du dosage et de dissolution par HPLC/DAD avec une colonne de type Lichrosorb® 100 RP C18 (250 x 4mm, 5µm), une phase mobile constituée d'un mélange binaire de la solution tampon phosphate à pH 4,0 et acétonitrile (70 V : 30V) au niveau de la pompe, à une longueur d'onde de 225 nm, à un débit de 1,5 ml / minute et à une température d'injecteur de 8°C. Nous avons, également, déterminé les paramètres optimaux permettant l'analyse des substances apparentées pour la validation de la recherche des substances apparentées par HPLC/DAD avec une colonne de type Hypersil® ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm), une phase mobile constituée d'un mélange binaire de la solution tampon phosphate à pH 6,8 et acétonitrile avec un gradient d'élution, à une longueur d'onde de 225 nm, à un débit de 2,2 ml / minute et à une température four colonne de 40°C.

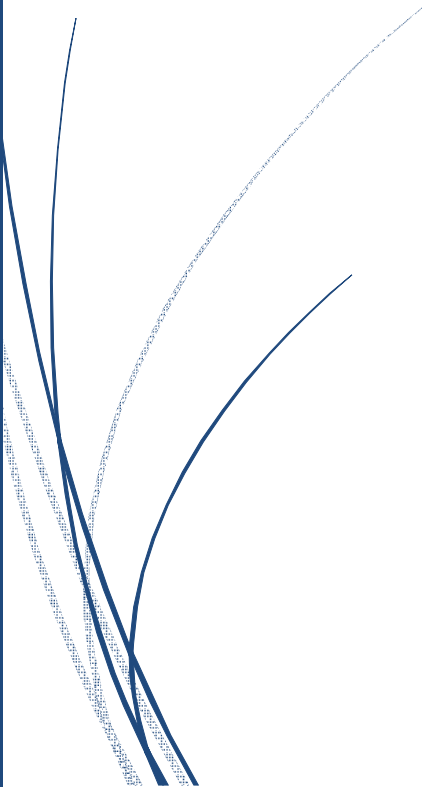
Ainsi, nous avons validé la méthode de dosage et de dissolution de Flucloxacilline sodique dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélule » par HPLC en montrant que la méthode adoptée est linéaire entre 70 et 130% de la concentration cible pour le dosage et entre 50 et 130% de la concentration cible pour la dissolution, exacte, fidèle et spécifique.

De plus, nous avons validé la méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélule » par HPLC en montrant que la méthode adoptée est linéaire entre 50 et 120% de la concentration cible, exacte, fidèle et spécifique. La limite de détection et de quantification de Flucloxacilline étaient respectivement de 35,2 ng/ml et de 106,8 ng/ml.

La méthode développée, optimisée et validée est simple, spécifique, rapide, précise, exacte, peut être appliquée en routine pour le screening de Flucloxacilline 500 mg dans la forme pharmaceutique gélule.



RESUME



RESUME

Titre : Développement et validation des méthodes de dosage, de dissolution et de recherche des substances apparentées de la Flucloxacilline sodique par HPLC

Auteur : Imane EL ASRI

Mots Clés : Flucloxacilline sodique, gélule, HPLC/ DAD, validation.

Objectif : Développement et validation d'une méthode de dosage, de dissolution et d'une méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique dans le produit fini «Flucloxacilline 500 mg gélules » par HPLC/DAD selon les recommandations d'ICH.

Matériel et méthodes : Le dosage et la dissolution ont été réalisés sur une colonne Lichrosorb C18 (250 x 4mm, 5µm) à 225 nm avec une phase mobile constituée d'acétonitrile-tampon phosphate de pH 4,0 (70V : 30V) et à un débit de 1,5 ml/min.

La recherche des substances apparentées a été réalisée sur une colonne Hypersil (250 x 4,6 mm, 5 µm) à 225 nm avec une phase mobile constituée d'acétonitrile-tampon phosphate de pH 6,8 avec un gradient d'éluion et à un débit de 2,2 ml/min.

Résultats : La méthode est linéaire dans une gamme de concentration de 70 à 130% pour le dosage et de 50 à 130% pour la dissolution de Flucloxacilline sodique dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélule », exacte, fidèle et spécifique.

La méthode de recherche des substances apparentées de Flucloxacilline sodique dans le produit fini « Flucloxacilline 500 mg gélule » est linéaire dans une gamme de concentration de 50 à 120%, exacte, fidèle et spécifique.

Conclusion : Selon les résultats de la validation, la méthode proposée est simple, spécifique, linéaire, exacte, fidèle et peut être appliquée à l'analyse du médicament « Flucloxacilline 500 mg gélule » avec un excellent taux de recouvrement, la limite de détection et de quantification de Flucloxacilline étaient respectivement de 35,2 ng/ml et de 106,8 ng/ml.

SUMMARY

Title: Development and validation of the methods of assaying, dissolving and researching related substances of Flucloxacillin sodium by HPLC

Author : EL ASRI Imane

Keys words: Flucloxacillin sodium, capsule, HPLC/DAD, validation.

Objective: Development and validation a reverse-phase HPLC/DAD according to the recommendations of ICH for the determination, dissolving and research of related substances of Flucloxacillin sodium in the drug product «Flucloxacilline 500 mg capsule ».

Materiel and methods: The determination and dissolving were studied on a column of type Lichrosorb C18 (250 x 4mm, 5µm) at 225 nm and a mobile phase was composed of acetonitrile-phosphate buffer at pH 4.0 (70V:30V) delivered at flow 1.5 ml/min.

The research of related substances was studied on a column of type Hypersil (250 x 4.6 mm, 5 µm) at 225 nm and a phase was composed of acetonitrile-phosphate buffer at pH 6.8 with elution gradient delivered at flow 2.2 ml/min.

Results: The method is linear in a concentration range from 70 to 130% for the assay and from 50 to 130% for the dissolving of Flucloxacillin sodium in drug product «Flucloxacilline 500 mg capsule », accurate, precise and specific.

The research of related substances of Flucloxacillin sodium in drug product «Flucloxacilline 500 mg capsule » method is linear in a concentration range from 50 to 120%, accurate, precise and specific.

Conclusion: According to the results of the validation, the proposed method is simple, specific, linear, accurate, precise, and could be applied to the analysis of the drug «Flucloxacillin 500 mg capsule » with an excellent recovery. No interference with excipients or degradation products of the pharmaceutical formulation were observed, the detection and the quantification limits of Flucloxacillin were 35.2 ng/ ml and 106.8 ng/ ml, respectively

ملخص

العنوان : وضع وإقرار أساليب الفحص، الانحلال والبحث عن المواد المرتبطة بالفلكوكساسيلين صوديوم بواسطة آش بي

إل سي

الكاتب: إيمان العسري

الكلمات الأساسية: الفلوكوكساسيلين، كبسولة، آش بي إل سي/ داد، التحقق

الهدف: تطوير والتحقق من صحة فحص، انحلال و بحث المواد المرتبطة بالفلكوكساسيلين صوديوم في فللكوكساسيلين 500 ميليغرام كبسولة" عن طريق آش بي إل سي/ داد وفقا لتوصيات المؤتمر الدولي للتوافق.

المواد والطرق: تم تنفيذ الفحص والانحلال على عمود ليكوسورب كربون 18، (250 × 4 ملمتر، 5 ميكرومتر) على موجة 225 نانومتر مع طور متحرك مكون من الأسيوتونتريل و فوسفات ذي حمضية تساوي 4.0 (70-30 حجم) و صبيب يساوي 1.5 مللتر في الدقيقة.

تم تنفيذ البحث عن المواد المرتبطة على عمود إبييرسيل (250 × 4.6 ملمتر، 5 ميكرومتر) على موجة 225 نانومتر مع طور متحرك مكون من الأسيوتونتريل و فوسفات ذي حمضية تساوي 6.8 مع تدرج الشطف و صبيب يساوي 2.2 مللتر في الدقيقة.

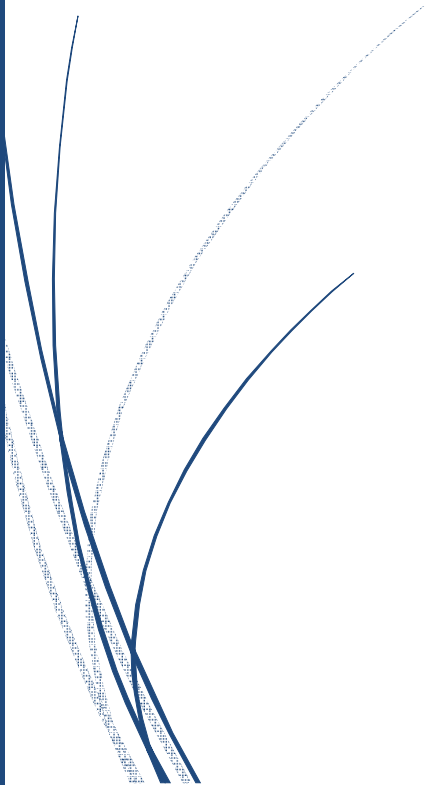
النتائج: الطريقة خطية في المجموعة ذات التركيز من 70 إلى 130 بالمئة بالنسبة للفحص ومن 50 إلى 130 بالمئة بالنسبة لانحلال الفللكوكساسيلين صوديوم في فللكوكساسيلين 500 ميليغرام كبسولة"، مضبوطة، دقيقة ومحددة.

الطريقة خطية في المجموعة ذات التركيز من 50 إلى 120 بالمئة بالنسبة لبحث المواد المرتبطة بالفلكوكساسيلين صوديوم في 'فللكوكساسيلين 500 ميليغرام كبسولة"، مضبوطة، دقيقة ومحددة.

استنتاج: وفقا لنتائج التحقق فإن الطريقة المقترحة بسيطة، محددة، خطية، دقيقة، ويمكن تطبيقها في تحليل الدواء فللكوكساسيلين 500 ميليغرام كبسولة" مع معدل تحصيل ممتاز. لم يلاحظ أي تداخل بين السواغ أو منتجات الانحلال مع بعضها البعض للتركيبية الدوائية، الحد من الكشف النوعي والكمي للفللكوكساسيلين هما على التوالي 35.2 نانوغرام / مللتر و 106.8 نانوغرام / مللتر.



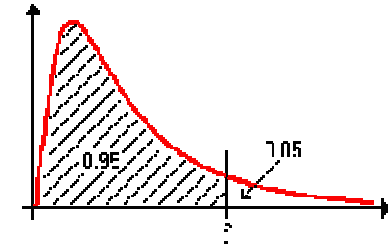
ANNEXES



Annexe 1

Table de Fischer

Valeur f de la variable de Fisher-Snedecor avec un intervalle de confiance de 95%



□ : degrés de liberté du numérateur
 □ : degrés de liberté du dénominateur

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	242.98	243.90	244.69	245.36	245.95	246.47	246.92	247.32
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.42	19.42	19.43	19.43	19.44	19.44
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.73	8.71	8.70	8.69	8.68	8.67
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.89	5.87	5.86	5.84	5.83	5.82
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.66	4.64	4.62	4.60	4.59	4.58
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.98	3.96	3.94	3.92	3.91	3.90
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.55	3.53	3.51	3.49	3.48	3.47
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.26	3.24	3.22	3.20	3.19	3.17
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.05	3.03	3.01	2.99	2.97	2.96
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.89	2.86	2.85	2.83	2.81	2.80
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.76	2.74	2.72	2.70	2.69	2.67
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.66	2.64	2.62	2.60	2.58	2.57
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.58	2.55	2.53	2.51	2.50	2.48
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.51	2.48	2.46	2.44	2.43	2.41
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.45	2.42	2.40	2.38	2.37	2.35
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.40	2.37	2.35	2.33	2.32	2.30
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.35	2.33	2.31	2.29	2.27	2.26
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.31	2.29	2.27	2.25	2.23	2.22

Annexe 2
Table de Student

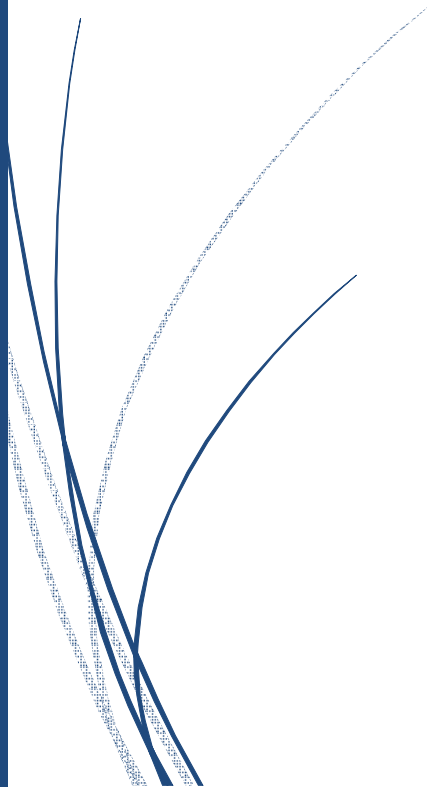
TABLE of CRITICAL VALUES for STUDENT'S t DISTRIBUTIONS

Column headings denote probabilities (α) **above** tabulated values.

d.f.	0.40	0.25	0.10	0.05	0.04	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
1	0.325	1.000	3.078	6.314	7.916	12.706	15.894	31.821	63.656	127.321	318.289	636.578
2	0.289	0.816	1.886	2.920	3.320	4.303	4.849	6.965	9.925	14.089	22.328	31.600
3	0.277	0.765	1.638	2.353	2.605	3.182	3.482	4.541	5.841	7.453	10.214	12.924
4	0.271	0.741	1.533	2.132	2.333	2.776	2.999	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.267	0.727	1.476	2.015	2.191	2.571	2.757	3.365	4.032	4.773	5.894	6.869
6	0.265	0.718	1.440	1.943	2.104	2.447	2.612	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.263	0.711	1.415	1.895	2.046	2.365	2.517	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.262	0.706	1.397	1.860	2.004	2.306	2.449	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.261	0.703	1.383	1.833	1.973	2.262	2.398	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.260	0.700	1.372	1.812	1.948	2.228	2.359	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.260	0.697	1.363	1.796	1.928	2.201	2.328	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.259	0.695	1.356	1.782	1.912	2.179	2.303	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.259	0.694	1.350	1.771	1.899	2.160	2.282	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.258	0.692	1.345	1.761	1.887	2.145	2.264	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.258	0.691	1.341	1.753	1.878	2.131	2.249	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.258	0.690	1.337	1.746	1.869	2.120	2.235	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.257	0.689	1.333	1.740	1.862	2.110	2.224	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.257	0.688	1.330	1.734	1.855	2.101	2.214	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.257	0.688	1.328	1.729	1.850	2.093	2.205	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.257	0.687	1.325	1.725	1.844	2.086	2.197	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.257	0.686	1.323	1.721	1.840	2.080	2.189	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.256	0.686	1.321	1.717	1.835	2.074	2.183	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.256	0.685	1.319	1.714	1.832	2.069	2.177	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	0.256	0.685	1.318	1.711	1.828	2.064	2.172	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.256	0.684	1.316	1.708	1.825	2.060	2.167	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.256	0.684	1.315	1.706	1.822	2.056	2.162	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	0.256	0.684	1.314	1.703	1.819	2.052	2.158	2.473	2.771	3.057	3.421	3.689
28	0.256	0.683	1.313	1.701	1.817	2.048	2.154	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.256	0.683	1.311	1.699	1.814	2.045	2.150	2.462	2.756	3.038	3.396	3.660
30	0.256	0.683	1.310	1.697	1.812	2.042	2.147	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
31	0.256	0.682	1.309	1.696	1.810	2.040	2.144	2.453	2.744	3.022	3.375	3.633
32	0.255	0.682	1.309	1.694	1.808	2.037	2.141	2.449	2.738	3.015	3.365	3.622
33	0.255	0.682	1.308	1.692	1.806	2.035	2.138	2.445	2.733	3.008	3.356	3.611
34	0.255	0.682	1.307	1.691	1.805	2.032	2.136	2.441	2.728	3.002	3.348	3.601
35	0.255	0.682	1.306	1.690	1.803	2.030	2.133	2.438	2.724	2.996	3.340	3.591
36	0.255	0.681	1.306	1.688	1.802	2.028	2.131	2.434	2.719	2.990	3.333	3.582
37	0.255	0.681	1.305	1.687	1.800	2.026	2.129	2.431	2.715	2.985	3.326	3.574
38	0.255	0.681	1.304	1.686	1.799	2.024	2.127	2.429	2.712	2.980	3.319	3.566
39	0.255	0.681	1.304	1.685	1.798	2.023	2.125	2.426	2.708	2.976	3.313	3.558
40	0.255	0.681	1.303	1.684	1.796	2.021	2.123	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	0.254	0.679	1.296	1.671	1.781	2.000	2.099	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	0.254	0.678	1.292	1.664	1.773	1.990	2.088	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	0.254	0.677	1.290	1.660	1.769	1.984	2.081	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
120	0.254	0.677	1.289	1.658	1.766	1.980	2.076	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
140	0.254	0.676	1.288	1.656	1.763	1.977	2.073	2.353	2.611	2.852	3.149	3.361
160	0.254	0.676	1.287	1.654	1.762	1.975	2.071	2.350	2.607	2.847	3.142	3.352
180	0.254	0.676	1.286	1.653	1.761	1.973	2.069	2.347	2.603	2.842	3.136	3.345
200	0.254	0.676	1.286	1.653	1.760	1.972	2.067	2.345	2.601	2.838	3.131	3.340
250	0.254	0.675	1.285	1.651	1.758	1.969	2.065	2.341	2.596	2.832	3.123	3.330
inf	0.253	0.674	1.282	1.645	1.751	1.960	2.054	2.326	2.576	2.807	3.090	3.290



*Références bibliographiques
et webographiques*



- [1] Flucloxacilline sodique. Pharmacopée Eur. janv 2008;(0668).
- [2] Sutherland R, Croydon EAP, Rolinson GN. Flucloxacillin, A New Isoxazolyl Penicillin, Compared With Oxacillin, Cloxacillin, And Dicloxacillin. *Br Med J.* 1970;4(5733):455-60.
- [3] Charles BG, Foo CC, Gath J. Rapid column liquid chromatographic analysis of flucloxacillin in plasma on a microparticulate pre-column. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 3 oct 1994;660(1):186-90.
- [4] Worlako Klu M, Selorm Addy B, Ntinagyei Mintah D. Simple validated RP- HPLC method for the analysis of flucloxacillin sodium in capsule dosage form (PDF Download Available). *ResearchGate.* 2016;5(4):499-508.
- [5] Ritchie SR, Rupali P, Roberts SA, Thomas MG. Flucloxacillin treatment of *Staphylococcus aureus* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* juill 2007;26(7):501-4.
- [6] Cunha BA. Antibiotic selection in the penicillin-allergic patient. *Med Clin North Am.* nov 2006;90(6):1257-64.
- [7] Organisation mondiale de la Santé OMS, Série de Rapports techniques, N° 957. Règles OMS de bonnes pratiques applicables par les laboratoires de contrôle qualité pharmaceutique, annexe 1. 2010.
- [8] Joint Committee for Guides in Metrology. Vocabulaire international de métrologie — Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM). 2008.
- [9] Chromatographie liquide. Pharmacopée Eur. (2.2.29).
- [10] MAHEUX M. Stratégies analytiques par chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse afin d'évaluer l'activité de neuf enzymes du cytochrome P450. Faculté des sciences et de génie Université LAVAL QUÉBEC; 2012.

- [11] Essai de dissolution des formes solides. Pharmacopée Eur. (2.9.3).
- [12] Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. ISO/CEI 17025:2005.
- [13] Gouvernement du Canada SC. Q2(R1) : Validation des méthodes d'analyse: Texte et méthodologie [Internet]. 2015 [cité 2 févr 2017]. Disponible à: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/applic-demande/guide-ld/ich/qual/q2r1-fra.php>
- [14] Caporal-Gautier J, Nivet J., Algranti P al. Analytical validation guide, Part I. STP Pharma Pratiques. 1992;205-26.
- [15] Caporal-Gautier J, Nivet J., Algranti P et al. Analytical validation guide, Part II. STP Pharma Pratiques. 1992;227-39.
- [16] Chapuzet E, Mercier N. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. STP Pharma Pratiques. 1997;169-94.
- [17] Hubert P, Nguyen-Huu J., Boulanger B et al. Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. STP Pharma Pratiques. 2003;101-38.
- [18] Hubert P, Nguyen-Huu J., Boulanger B et al. Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. Part II. Statistics. STP Pharma Pratiques. 2006;30-60.
- [19] Hubert P, Nguyen-Huu J., Boulanger B et al. Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. Part III. Examples of application. STP Pharma Pratiques. 2006;87-121.
- [20] Hubert P, Nguyen-Huu J., Boulanger B et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal part IV. Examples of application. J Pharm Biomed Anal. 2008;760-71.

- [21] Lecompte D. Validation d'une méthode de dosage par chromatographie liquide. STP Pharma pratiques,. 2 (hors série). 1986;843-9.
- [22] VUAGNAT C, CAUQUIL J, MATHIEU JR. Etalonnages et calibration linéaire. Editions de santé. STP pharma pratiques. 1992;149-59.
- [23] CAPORAL-GAUTIER J, NIVET J., ALGRANTI P, GUILLOTEAU M, HISTE M, LALIER M, et al. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. II : Exemples d'application. Editions de santé. STP pharma pratiques. 1992;227-39.
- [24] CAPORAL-GAUTIER J, NIVET J., ALGRANTI P, GUILLOTEAU M, HISTE M, LALIER M, et al. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I : Méthodologie. Editions de santé. STP pharma pratiques. 1992;205-26.
- [25] BOUKLOUZE A, CHERRAH Y. Validation des procédures analytiques selon la nouvelle approche basée sur l'erreur total (profil d'exactitude). LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE; 2009.
- [26] DERRAJI S, EL M'RABET M, DACHOUR A, CHERRAH Y, BOUKLOUZE A. Validation of an uv-visible method for the assay of diclofenac sodium: Its use in decontamination rate of this active ingredient by natural adsorbents. ResearchGate. 2015;6(3):818-25.
- [27] Saber AL, Elmosallamy MA, Killa HM, Ghoneim MM. Selective potentiometric method for determination of flucloxacillin antibiotic. J Taibah Univ Sci. 2013;7:195-201.
- [28] Squella JA, Silva MM, Nuñez-Vergara LJ. Anodic polarographic determination of flucloxacillin. Talanta. nov 1981;28(11):855-6.

- [29] SUDDHASATTYA D, RATNAKAR C, VAITHIYANATHAN S, HIMANSU BHUSAN S, Y.VIKRAM R, BALA K, et al. Spectrophotometric method developed for the estimation of Flucloxacillin in bulk and dosage form using UV-VIS spectrophotometric method. *Int J Pharma Bio Sci.* 2010;1(4):35-43.
- [30] Attia KAM, Nassar MWI, El-Zeiny MB, Serag A. Different spectrophotometric methods applied for the analysis of binary mixture of flucloxacillin and amoxicillin: A comparative study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 15 mai 2016;161:64-9.
- [31] Jun H, Wakai J, Yasuda H, Uno T. Spectrophotometric Assay of Penicillins by Reaction with 1,2,4- Triazole and Mercury (II) Chloride. *Anal Sci.* 1985;1:73-6.
- [32] Refat MS, El-Didamony AM. Spectrophotometric and electrical studies of charge-transfer complexes of sodium flucloxacillin with pi-acceptors. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* nov 2006;65(3-4):732-41.
- [33] Mohamed GG. Spectrophotometric determination of ampicillin, dicloxacillin, flucloxacillin and amoxicillin antibiotic drugs: ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate. *J Pharm Biomed Anal.* févr 2001;24(4):561-7.
- [34] Zhou Q, Ruan Z, Yuan H, Jiang B, Xu D. RP-HPLC analysis of flucloxacillin in human plasma: validation and application to a bioequivalence study. *Pharm.* févr 2007;62(2):101-4.
- [35] Briscoe SE, McWhinney BC, Lipman J, Roberts JA, Ungerer JPJ. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 15 oct 2012;907:178-84.

- [36] Shanmugasundaram P, Kamal Raj R, Mohanrangan J, Devdass G, Arunadevi M, Maheswari R, et al. Simultaneous estimation of amoxicillin and flucloxacillin in its combined capsule dosage form by HPLC. *Janv 2009*;2(1):57-60.
- [37] Nikam DS, Chandrakant GB, Surana S., Venkateshwarlu G, Dekate P. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Amoxicillin trihydrate and Flucloxacillin sodium in capsule dosage form. *Int J PharmTech Res.* 2009;1(3):935-9.
- [38] Liu H, Wang H, Sunderland VB. An isocratic ion exchange HPLC method for the simultaneous determination of flucloxacillin and amoxicillin in a pharmaceutical formulation for injection. *J Pharm Biomed Anal.* 23 févr 2005;37(2):395-8.
- [39] Manish G, Monica G, Saranjit S. Stability-indicating analysis of isoxazolyl penicillins using dual wavelength high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B.* 1998;153-9.
- [40] Rapport de validation analytique du dosage et de la recherche des substances apparentées du granulé Flucloxacilline conformément à la Pharmacopée Européenne en vigueur. *Saham Pharma.* déc 2016;
- [41] Bouklouze A, Kharbach M, Cherrah Y, Vander Heyden Y. Azithromycin assay in drug formulations: Validation of a HPTLC method with a quadratic polynomial calibration model using the accuracy profile approach. *Ann Pharm Fr.* 27 sept 2016;
- [42] El Karbane M, Azougagh M, Amood A L-Kamarany M, Bouchafra H, Cherrah Y, Bouklouze A. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous analysis of butylhydroxyanisol, simvastatin and its impurities in tablet dosage forms. *Ann Pharm Fr.* juill 2014;72(4):244-55.

- [43] Derraji S, EL M'Rabet M, Dahchour A, Cherrah Y, Bouklouze A. Validation of an UV-Visible method for the assay of diclofenac sodium: Its use in decontamination rate of this active ingredient by natural adsorbents. JMESCEN. 2015;6(3):818-25.
- [44] Loudiki A, Boumya W, Hammani H, Nasrellah H, El Bouabi Y, Zeroual M, et al. Ibuprofen analysis in blood samples by palladium particles-impregnated sodium montmorillonite electrodes: Validation using high performance liquid chromatography. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 1 déc 2016;69:616-24.

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 publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne 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 méprisée de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرياض -

قسم الصيدلي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أَحْسِبُ بِاللَّهِ الْعَظِيمِ

- ◀ أن أراقب الله في مهنتي
- ◀ أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوماً وفيّاً لتعاليمهم.
- ◀ أن أزاوّل مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبداً في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى 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 بالالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

جامعة محمد الخامس - الرباط
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 64

سنة : 2017

**وضع وإقرار أساليب الفحص والبحث
عن المواد المرتبطة بالفلكوكساسيلين
صوديوم بواسطة آش بي إل سي**

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرف

الآنسة: إيمان العسري

المرددة في: 21 مارس 1992 بتمنار الصويرة

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: الفلوكوكساسيلين - كبسولة - آش بي إل سي/ داد - التحقق.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس	السيد: عبد العزيز بوكلوز
مشرف	أستاذ في علم السموم السيد: يحيى الشراح أستاذ في علم الصيدلة
أعضاء	السيد: جواد الحارثي أستاذ في الكيمياء العلاجية السيد: مصطفى دراوي أستاذ في الكيمياء التحليلية