



CV : coefficient de variance.

DT : dossier technique.

HPLC : chromatographie liquide à haute performance.

PF : produit fini.

ISO : organisation internationale de normalisation

LNCM : laboratoire national de contrôle des médicaments.

MP : matière première.

UV : ultra violet

OMS : organisation mondiale de la santé.

SCR : Substance chimique de référence.

Sommaire

Introduction.....
.....1

Chapitre 1: Généralités sur les médicaments et les analyses physico-chimiques

I- Présentation du laboratoire national de contrôle des médicaments : 4

 I-1 Présentation des activités du LNCM : 4

 II-Généralités sur les médicaments : 5

 II-1- Définition : 5

 II-2-Définitions des termes reliés aux médicaments 7

 III- Techniques d'analyse physico-chimiques : 9

 III-1- La spectroscopie d'absorption dans l'UV visible : 9

 III-2- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) 10

 III-2-1- le temps de rétention et volume de rétention: 10

 III-2-2-facteur de symétrie (ou de traînée) AS : 10



III-2-3-Résolution : 10

III-2-4-La formule de La teneur en % de principe actif dans la matière première : 11

III-2-5La formule de La teneur en % de principe actif dans le produit fini: 11

Chapitre 2 : Les antibiotiques : Spiramycine, Gentamycine et Rifamycine:

IV- Les antibiotiques : 17

IV-1 Définition : 18

IV-2- Classification des antibiotiques: 13

IV-2-1-L'origine de l'antibiotique : 14

IV-2-2-La nature chimique de l'antibiotique : 14

IV-2-3-Les modes d'action : 14

IV-2-4-Les modalités d'action des antibiotiques : 14

IV-2-5-Le spectre d'activité : 15

IV-3- Spiramycine : 16

IV-4-Gentamycine : 18

IV-5-Rifamycines : 20

Chapitre 3 : La sensibilité bactérienne de Spiramycine et Gentamycine :

V-L'étude de la sensibilité : 24

V-1 Matériel et méthodes : 24

V-2-Résultats et Discussion : 33

V-2-1-Dosage de l'activité biologique des 2 antibiotiques non périmés : 33

V-2-2-Dosage de l'activité biologique des 2 antibiotiques périmés : 32

Chapitre 4 : Le dosage des antibiotiques par la méthode HPLC :

VI-Dosage du principe actif par HPLC : 38

VI-1-Dosage de la Spiramycine périmée par HPLC : 39

VI-2-Résultats et discussions: 37



VI-3-Dosage de la Gentamicine par HPLC :.....	41
VI-4-Résultats et Discussions :.....	42
VII-Rifamycine :.....	48
VII-1-Dosage de la Rifamycine par UV :.....	48
VII-2-Résultats et discussions :	51
VII-3-Dosage de la Rifamycine par HPLC :	51
VII-4-Résultats et Discussions :.....	52
Conclusion	58
Perspective :.....	59
Références	
bibliographiques.....	60



Introduction

Le problème des qualités des médicaments est un problème majeur de la santé publique. Pour satisfaire les besoins des patients qui attendent des médicaments qui leur sont prescrits, il faut que ces derniers présentent toutes les garanties de qualité, d'efficacité et de sécurité, condition recommandé par l'organisation mondiale de la santé. C'est pour cette raison que des systèmes ont été élaborés pour contrôler les médicaments dans le but de permettre leur commercialisation sur le marché sans aucun danger pour la santé publique.

Le laboratoire national de contrôle des médicaments est le seul organisme à qui il incombe ce rôle qui est celui de pratiquer un contrôle sévère en terme de qualité de travail des médicaments marocains, pour assurer une qualité sans faille de ces produits mis sur le marché national. Il assure aussi ce contrôle dans le cadre d'une législation stricte et des réglementations en vigueur.

Le service d'analyses physico chimiques constitue une entité qui conduit une grande partie des analyses appliquées aux contrôles des médicaments. Elles sont effectuées sur la base des exigences de la pharmacopée Européenne, ainsi que celle du dossier technique (confidentiel). Ce dernier est fourni par les laboratoires fabricants des spécialités pharmaceutiques. Ces dossiers fournissent une grande partie sinon la totalité des renseignements nécessaires à l'identification et au dosage de ces spécialités.

Notre travail s'inscrit dans cette logique, de contrôler l'activité thérapeutique des deux antibiotiques (Gentamycine et Spiramycine) en faisant une étude comparative entre leur teneur en principe actif dosé par HPLC et leur action sur les souches bactériennes sélectionnées (*Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilis*).



L'objectif de notre travail consiste à faire des tests de sensibilités des antibiotiques périmés et non périmés ainsi que des dosages de ces derniers par HPLC afin d'établir une relation entre la teneur en principe actif et la sensibilité des germes. Ainsi est-il nécessaire de savoir si réellement la méthode HPLC peut être une méthode alternative pour refléter l'activité biologique de certains antibiotiques à partir de leur teneur en principe actif ?

Ce présent mémoire est réparti en quatre chapitres :

- Le premier chapitre présente quelques généralités sur les médicaments et les analyses physico chimiques
- Le deuxième chapitre décrivant la définition et la classification des antibiotiques et principalement Spiramycine, Gentamycine et Rifamycine.
- Le troisième chapitre est l'étude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques
- Le quatrième chapitre traite le dosage des antibiotiques par la méthode HPLC.



Chapitre 1 : Généralités sur les médicaments et les analyses physico-chimiques

I- Présentation du laboratoire national de contrôle des médicaments :

I-1 Présentation des activités du LNCM :

« Les déterminations analytiques et les essais que nécessite le contrôle des médicaments et des spécialités pharmaceutiques, objets de pansements et tout autre article destiné à l'usage de la médecine humaine, et contribuer à l'enseignement médico-pharmaceutique. »

→ le contrôle du médicament s'effectue selon les modalités suivant :

Le contrôle de visa :

Effectué sur les spécialités sollicitant l'Autorisation de débit des spécialités pharmaceutiques (ADSP).



 **Le contrôle d'inspection :**

Etant sous la responsabilité d'inspecteurs pharmaciens qui sont chargés de visiter les laboratoires pharmaceutiques et les officines, à un rythme biannuel, d'où ils prélèvent des échantillons afin de les contrôler au sein du laboratoire.

 **Le contrôle de livraison :**

S'applique à tous les médicaments livrés aux hôpitaux à partir de l'unité d'approvisionnement.

 **Le contrôle de produits d'homologation :**

Il est réalisé sur des produits qui demandent une autorisation de débit des spécialités pharmaceutiques sur le marché national (dispositifs médicaux et articles de puériculture destinés à l'enfant de 1^{er} âge).

 **Le contrôle de produits de réclamation :**

Ce contrôle se fait systématiquement en cas de réclamation des utilisateurs (médecins, citoyens...)

→ Le LNCM est chargé également d'étudier conformément aux circulaires ministérielles :

- La documentation pharmaceutique, clinique et pharmaco toxicologique.
- Les bulletins d'analyses des produits finis importés.
- Les bulletins d'analyses des matières premières actives.
- Les dossiers des vaccins et sérum en vue de l'octroi d'un certificat de libération de lot.

→ Le LNCM est aussi :



- Inscrit sur la liste des laboratoires officiels de l'OMS
- Laboratoire de référence de la ligue arabe
- Membre observateur de la Pharmacopée Européenne
- Membre du réseau des laboratoires nationaux européens du contrôle des médicaments [1].

II-Généralités sur les médicaments :

II-1- Définition :

✚ Médicament :

Le médicament dérive du mot latin « Medicamentum » qui veut dire « remède ».

Le Dahir portant loi n°1-76-432 de février 1977, B.o n°3369, ainsi que l'article L511 du code de la santé publique définissent le médicament comme suit :

« On entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ». (Article. L. 5111-1 du code de la santé publique)

✚ Composition d'un médicament :

Un médicament est constitué de Principe actif, excipient, et parfois des additifs.

✚ Principe actif :

C'est une substance pharmacologiquement active au niveau de l'organisme ; établie à l'origine des indications thérapeutiques. Son dosage est établi en fonction de la puissance du patient



(enfant, adulte) la plupart du temps, en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients.

 **Excipient :**

C'est une substance inerte au plan thérapeutique, permettant la préparation du médicament. L'excipient a pour fonction d'améliorer l'aspect ou le goût, d'assurer la conservation, de faciliter la mise en forme et l'administration du médicament. Il sert aussi à acheminer la substance active vers son site d'action et à contrôler son absorption par l'organisme. L'excipient devrait être bien toléré. Les excipients les plus courants sont l'amidon, le sucre, la gélatine, les graisses, l'eau, l'alcool ...

L'ensemble principe (s) actif (s) et excipients, formulés et préparés à l'avance selon des normes internationales strictes « les bonnes pratiques de fabrication » constituent une spécialité dotée d'une dénomination commerciale appartenant au laboratoire fabricant.

II-2-Définitions des termes reliés aux médicaments

 **Spécialité Pharmaceutique :**

Correspond selon le code de la santé publique à un médicament préparé à l'avance, dosé au poids medicinal présenté sous un conditionnement particulier, et caractérisé par une dénomination spéciale portant sa composition, le nom et l'adresse du fabricant.

 **Pharmacopée :**

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une pharmacopée est une norme pharmaceutique destinée à assurer dans une entité politique donnée, l'uniformité de la nature, de la qualité, de la composition et de la concentration des médicaments.



Il existe plusieurs pharmacopées : Française, Britannique, américaine (USP), Japonaise, Chinoise et internationale.

Chaque pharmacopée est constituée de plusieurs parties : Les monographies, les prescriptions générales, les réactifs et les méthodes générales d'analyses.

 **Drug Master File (D.M.F) :**

Le D.M.F. est une documentation référentielle et confidentielle rédigé par le fournisseur des matières premières. Il porte tous le détail du PA : nomenclature, description, développement chimique, la qualité des matières premières, la synthèse ou le mode de préparation des matières premières, le contrôle de qualité durant la fabrication, l'isométrie, le polymorphisme, les impuretés et les essais de stabilité.

 **les impuretés :**

Les impuretés apparaissent pendant la synthèse du principe actif ; elles peuvent comprendre les produits de dégradation, de synthèse, stéréo-isomères, des produits de réactions secondaires, etc. Elles devraient être identifiées, qualifiées et étudiées sur le plan toxicologique.

 **L'étalonnage :**

L'étalonnage est un processus de comparaison d'un élément « inconnu » par rapport à un standard équivalent ou meilleur ; ils sont classés en étalon international, national, étalon primaire et secondaire.

 **les substances chimiques de référence SCR:**

La substance chimique de référence est définie comme un matériau prévu pour être utiliser dans des essais chimiques et physiques spécifiques, dans lesquels ces propriétés sont comparées aux propriétés des échantillons à examiner. Le degré de pureté d'une telle substance dépend du but de son utilisation.

 **Autorisation de Débit d'une Spécialité Pharmaceutique (ADSP) :**



Aujourd’hui au Maroc, grâce à son propre système ADSP, tous les médicaments sont contrôlés par le LNCM en vue d’assurer le respect des exigences actuelles en matière de sécurité, de qualité et d’efficacité.

Un système d’ADSP permet d’assurer que tous les produits autorisés sur le marché Marocain ne sont fabriqués que par des fabricants agréés, dont les activités sont régulièrement inspectées par l’autorité compétente LNCM.

⇒ **Définition de l’ADSP**

Au Maroc, le nom d’ADSP remplace le nom AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) du pays d’origine.

L’OMS définit L’AMM comme étant un document officiel émis par l’autorité compétente, établi en vue de la commercialisation ou la distribution d’un produit.

Ce document doit préciser, notamment, la dénomination, la forme, la composition, la durée et les conditions de conservation ainsi que les caractéristiques du conditionnement. Il contient également toute l’information approuvée, destinée au corps médical et au public et précise les conditions de délivrance, le nom et l’adresse du titulaire de l’AMM et la durée de la validité de cette autorisation [1].

III- Techniques d’analyse physico-chimiques :

III-1- La spectroscopie d’absorption dans l’UV visible :

Certaines molécules organiques ont la propriété d’absorber les radiations de courte longueur d’onde (200-800 nm) et peuvent être caractérisées grâce à cette propriété.

Le domaine du visible et de l’UV a été abondamment étudié et ce depuis longtemps. Mais s'il est indispensable pour une approche expérimentale de la nature de la liaison, il est pauvre en information structurale. Son emploi est de plus en plus réservé à l’analyse quantitative via la loi de Beer-Lambert [2].

⊕ **Identification par UV visible :**



L'identification, dans le domaine de l'ultraviolet visible, nécessite l'emploi d'une substance de référence. On enregistre d'abord le spectre de référence puis dans les mêmes conditions celui de la substance à identifier et /ou à doser.

Dosage par l'UV

Le dosage spectrophotométrique comporte en général une comparaison entre la densité optique d'une solution contenant la substance à examiner et celle d'une solution contenant la substance de référence.

Il existe une relation entre la quantité de la lumière absorbée et la concentration de la substance en solution appelée la loi de Beer-Lambert [2] :

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon l C$$

A : Absorbance ou densité optique

I₀ : Intensité du rayonnement incident

I : Intensité du rayonnement après la traversée de l'échantillon

ε : Coefficient d'absorption à une longueur d'onde

l : longueur du trajet optique dans la (l'épaisseur de la cuve)

C : Concentration de la solution à analyser.

NB : Cette loi ne s'applique qu'aux solutions diluées et avec des radiations monochromatiques.

III-2- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

III-2-1- le temps de rétention et volume de rétention:

En chromatographie d'élution, les mesures de rétention peuvent être exprimées en termes de temps de rétention t_R directement défini par la position du maximum du pic dans le chromatogramme.

Le t_R peut être déduit par le calcul de volume de rétention VR

$$V_R = V * t_R$$

V : débit de la phase mobile



t_R : temps de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissé du max du pic correspondant au composant considéré [2].

III-2-2-facteur de symétrie (ou de traînée) AS :

AS d'un pic est donné par l'expression :

$W_{0.05}$: largeur du pic au vingtième de sa hauteur.

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

d : distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum de pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.

III-2-3-Résolution :

R_s entre deux pics peut être calculé par l'expression :

W_h : largeur du pic

$$R_s = \frac{(1.18 (t_{R2} - t_{R1}))}{W_{h1} + W_{h2}}$$

III-2-4-La formule de La teneur en % de principe actif dans la matière première :

$$T\% = \text{Aire Essai} / \text{Aire STD} \times mSTD / VSTD \times VE / mE \times TSTD (\%) \times 100 / (100 - T.eau)$$

m STD : masse de la substance chimique de référence en mg

m E : masse d'essai en mg

TSTD : Titre de la substance chimique de référence

VSTD : volume de dilution de standard en ml

T eau: Teneur en eau du STD

VE : volume de dilution d'essai

III-2-5La formule de La teneur en % de principe actif dans le produit fini:

$$T (mg/ unité) = \text{Aire Essai} / \text{Aire STD} \times mSTD / VSTD \times VE / mE \times PM \times TSTD (\%) / 100 \times 100 / (100 - T.eau)$$

$$T (\%) = T (mg/ unité) \times 100 / VT$$

m STD : masse de la substance de référence (mg)

mE : masse d'essai (mg)

TSTD : Titre de la substance chimique de référence

VSTD : volume de dilution de standard

T eau: teneur en eau du STD

VE : volume de dilution d'essai

VT : valeur théorique déclarée dans la Spécialité pharmaceutique [2].



Chapitre 2 :

Les antibiotiques : Spiramycine, Gentamycine et Rifamycine



IV- Les antibiotiques :

IV-1 Définition :

Pendant longtemps on a appelé antibiotique toute substance chimique pouvant inhiber la croissance ou détruire d'autres micro-organismes. Cette définition est aujourd'hui trop restrictive et doit être abandonnée car les molécules obtenues par synthèse ou par modification chimique d'une molécule naturelle peuvent être douées des mêmes propriétés. Un antibiotique est actuellement défini comme toute substance d'origine biologique ou synthétique agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries (agent antibactérien) ou des champignons, et pouvant être administré à l'organisme.

Les antiseptiques à la différence des antibiotiques ont une action le plus souvent brutale et non spécifique. Ils sont trop toxiques pour être administrés à l'homme par voie générale.

Quelle que soit l'origine de l'antibiotique, il doit avoir les propriétés suivantes :

Une action antibactérienne

Une toxicité sélective

Une activité en milieu organique

Une possibilité d'absorption et de diffusion dans l'organisme [3].

IV-2- Classification des antibiotiques:

Les antibiotiques sont classés selon leur structure de base, leur mécanisme d'action, leur spectre d'activité et leurs propriétés pharmacologiques. Les antibiotiques ayant une structure chimique identique, leur conférant un même mécanisme d'action antibactérienne se classent dans la même famille. Il existe onze grandes familles d'antibiotiques auxquelles, il faut ajouter diverses molécules isolées à activités antibactériennes. Plusieurs familles d'antibiotiques peuvent avoir un même mode d'action. C'est ainsi que certains agissent par inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne.



D'autres encore inhibent la synthèse des acides nucléiques. Les antibiotiques d'une même famille peuvent se différencier par leur spectre d'activité. On les réunit alors dans des groupes quelque fois subdivisés en sous-groupes. Les antibiotiques d'un même groupe ou d'un même sous-groupe diffèrent uniquement par leurs propriétés pharmacologiques. Leur activité *in vitro* est identique. Cette classification constitue un guide pratique des antibiotiques dont la connaissance est indispensable pour leur utilisation correcte [3].

IV-2-1-L'origine de l'antibiotique :

Les antibiotiques sont élaborés par organisme vivant ou/et produits par synthèse. A l'heure actuelle, il s'agit souvent de molécules, le plus souvent obtenues par hémisynthèse.

IV-2-2-La nature chimique de l'antibiotique :

Très variable, souvent une structure de base comme le cycle beta-lactame (famille des beta-lactamines) sur laquelle il ya hémisynthèse. Ce classement donne souvent, le nom a la famille.

IV-2-3-Les modes d'action :

On regroupe souvent les antibiotiques selon leur mode d'action. L'activité thérapeutique des antibiotiques se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des microorganismes.

IV-2-4-Les modalités d'action des antibiotiques :

Certains antibiotiques sont bactéricides, c'est-à-dire qu'ils détruisent la bactérie, tandis que d'autres, bactériostatiques, l'empêchent simplement de se multiplier.

- Bactériostatique : le nombre de bactéries variables après un temps d'incubation et de contact donné avec un antibiotique est inférieur à celui observé, en l'absence d'antibiotique (témoin).
- Bactéricides : le nombre de bactéries tuées après un temps d'incubation et de contact donné avec un antibiotique est inférieur à celui déterminé au temps 0. Donc arrêt de croissance et mortalité quantifiable en temps de CMB (concentration minimale bactéricide) [4].



IV-2-5-Le spectre d'activité :

Un antibiotique a un spectre d'activité large (pénicillines qui affectent la plupart des bactéries Gram+ et Gram-) ou étroit (nystatine qui n'agit que contre les champignons) selon qu'ils s'attaquent à plusieurs types de microorganismes ou à quelques espèces seulement [4].

Familles ou molécules non classées (Modes d'action)	Principales molécules	Spectre
Acide fusidique (Inhibition de la synthèse des protéines)	Acide fusidique	Étroit (coques à Gram positif, coques à Gram négatif, bacilles à Gram positif)
Aminosides ou aminoglycosides (Inhibition de la synthèse des protéines)	Gentamicine Spectinomycine Streptomycine	Large (sauf bactéries anaérobies). Les streptocoques et les <i>Listeria</i> sp. sont peu sensibles.
Macrolides (Inhibition de la synthèse des protéines)	Érythromycine Josamycine Spiramycine	Étroit (essentiellement coques à Gram positif, coques à Gram négatif, bacilles à Gram positif)
Rifamycines (ansamycines) (Blocage de la synthèse des ARN-messagers)	Rifamycine SV, rifaximine Rifampicine	Étroit (coques à Gram positif, coques à Gram négatif, bacilles à Gram positif) Large
Tétracyclines (Inhibition de la synthèse des protéines)	Chlortétracycline Déméthyl-chlortétracycline Tétracycline	Large
Bêta-lactamines	Amoxicilline Acide clavulanique	Large mais inactives sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .

Les principales familles d'antibiotiques [5].



IV-3- Spiramycine :

Définition :

Macrolide antibiotique élaboré par certaines souches de *streptomyces ambofaciens* constitué principalement de(4R,5S,6S,7R,9R,10R,11E,13E,16R)-6-[[3,6-didésoxy6-3-C-méthyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)-3-(diméthylamino)- β -D-glucopyranosyl]-oxy]-4-hydroxy-5-méthoxy-9,16-diméthyl-7-(2-oxoéthyl)-10-[[2,3,4,6-tétradéoxy-4(diméthylamino)-D-érythro hexopyranosyl]oxyloxacyclohexadéca-11,13-dién-2-one (spiramycine I ;M 834)
La spiramycine II (4-O-acétylspiramycine I) et la spiramycine III (4-O-propanylspiramycine I) sont également présentes.

Activité : au minimum 4100 UI/mg (substance desséchée) [6].

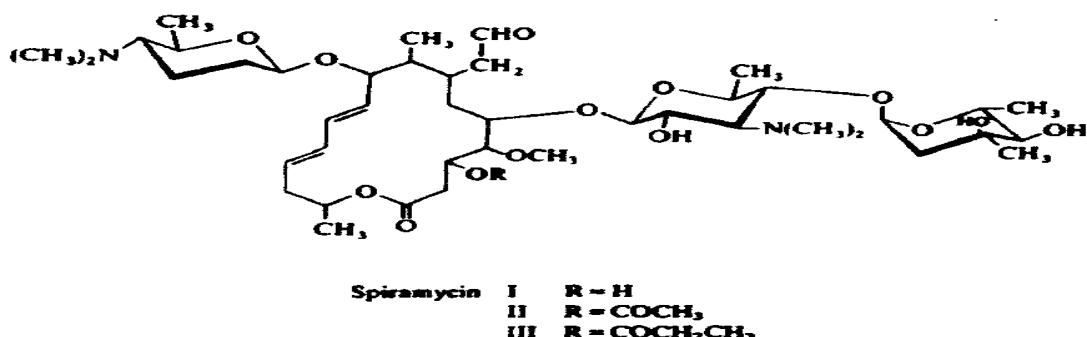
Caractères :

Aspect : poudre blanche ou faiblement jaunâtre, et faiblement hygroscopique.

Solubilité :

Peu soluble dans l'eau facilement soluble dans l'acétone, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol [6].

Structure chimique :





Initialement destinée à la médecine humaine, La spiramycine a également été développée en médecine vétérinaire. Chez l'homme, elle avait suscité un regain d'intérêt dans les années 80-90 avec l'évaluation de la pathologie, du fait par exemple de son activité sur la légionellose, sur les souches de *Streptococcus pneumoniae* résistantes à la benzylpénicilline et de son intérêt dans le traitement de la toxoplasmose congénitale [7].

La spiramycine est complexe formé de trois composants majeurs (I ; II ; III) qui se différencient par le substituant en position 3 du noyau lactonique : 3 OH (spiramycine I), 3-O-acétyl (spiramycine II) et 3-O-propionyl (spiramycine III) autrement dit, les spiramycine II et III dérivent respectivement d'une acétylation et d'une propionylation de la spiramycine I (Tableau I).

La spiramycine est le seul macrolide possédant un noyau à 16 atomes de carbones qui contiennent deux sucres diméthylamino substitués ce qui pourrait rendre compte de l'absence de toxicité hépatique. La spiramycine I est la forme principale. Les autres composantes ne doivent représenter qu'au maximum 15 % de la spiramycine totale selon les recommandations de la pharmacopée européenne.

La composition de la matière première est la suivante (par rapport à la substance desséchée) :

- Spiramycine I > 80%
- Spiramycine II < 5%
- Spiramycine III < 10%
- Spiramycine I + spiramycine II + spiramycine III > 90%

Tableau I : Caractéristiques des différents composés de la Spiramycine

Forme de la spiramycine	Formule brute	Poids moléculaire en Dalton
I	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	843.07
II	C ₄₅ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	885.11
III	C ₄₆ H ₇₈ N ₂ O ₁₅	899.14



Les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la Spiramycine I, II et III sont très voisines [7].

Spectre d'activité et utilisation thérapeutique de la Spiramycine :

Le spectre antibactérien naturel des macrolides recouvre les bacilles et coques à gram positif, les cocci à gram négatif, les bactéries à gram positif anaérobies strictes, certains bacielles à gram négatif, comme *Haemophilus infeluenzae*, *Moraxella catarrhalis* et les mycoplasmes.

La Spiramycine présente de nombreuses indications chez la plupart des espèces domestiques en pathologie respiratoire, dans le traitement des mammites chez la vache, dans les staphylococcies et mycoplasmes chez les porcins et les volailles.

Mécanisme d'action :

Les macrolides doivent leur activité antibiotique à leur liaison à la sous-unité 50S du ribosome bactérien et plus précisément au niveau du complexe 23S de l'ARN et bloquent ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse. Ce mode d'action implique que les macrolides sont essentiellement bactériostatiques, sauf à concentration très élevée.

Spectre d'activité :

Ces substances ont un spectre relativement étroit limité aux germes suivants :

- C cocci à Gram positif [8].

Effet indésirables :

La Spiramycine n'a pas d'effets tératogènes connus et sa bonne tolérance lui permet d'être prescrite aussi bien chez la femme enceinte que chez le nouveau né. Il peut survenir des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées) et des manifestations cutanées allergiques [9].

IV-4-Gentamycine :

Définition :

Le sulfate de Gentamycine est constitué par un mélange de sulfates des substances antimicrobiennes produites par *Micromonospora purpurea*. L'activité du sulfate de Gentamycine n'est pas inférieure à 590 UI/mg, calculée par rapport à la substance anhydre [6].

Caractères :

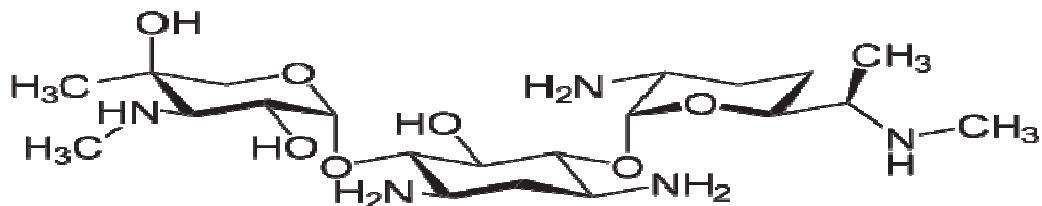
Aspect : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.



Solubilité :

Pratiquement insoluble dans l'eau facilement soluble dans 'éther, assez soluble dans l'acétone et dans les huiles grasses [6].

Structure chimique :



La gentamycine est un antibiotique de famille aminosides, se manifeste dans le traitement des infections bactériennes graves,

Spectre d'action

En particulier ceux causées près Gram négatif bactéries. Elle agit sur un grand nombre d'espèces bactériennes parmi celle qui sont anaérobies strictes (streptocoque, pneumocoque).

Mécanisme d'action

Elle active la synthèse des protéines (elle se fixe sur la fraction 30 S du ribosome. Il en résulte une modification de la conformation ribosomale responsable d'erreur de traduction entraînant la formation des protéines anormales ayant perdu leurs fonctions).

Il est synthétisé près Micromonospora, un genre de Bactéries gram positives largement présent dans l'environnement (l'eau et sol).

Comme tous les aminoglycosides, quand la gentamicine est donnée oralement, il n'est pas systématiquement en activité. C'est parce qu'il n'est absorbé jusqu'à aucun degré appréciable de petit intestin. Il semble être complètement éliminé sans changement dans l'urine. L'urine doit être prélevée pendant beaucoup de jours pour récupérer toute la dose donnée parce que la drogue lie avide à certains tissus. Il est administré en intraveineuse, en intramusculaire ou topique pour traiter des infections [10].



La gentamicine est l'un des quelques antibiotiques thermostables qui restent actifs même après la stérilisation à l'autoclave, qui le rend particulièrement utile dans la préparation de certains médias microbiologiques de croissance.

Pour la détermination de la zone thérapeutique de la gentamicine, les concentrations au pic et à la vallée doivent être mesurées. Une insuffisance rénale préexistante, un traitement à la gentamicine prolongé, de même que les doses supérieures aux concentrations thérapeutiques peuvent conduire à une toxicité auditive ou une néphrotoxicité.

La surveillance des concentrations de gentamicine au pic et à la vallée est donc essentielle pour la prévention.

L'usage est limite à cause d'effets secondaires indésirables tels que l'écotoxicité, la néphrotoxicité et la toxicité neuromusculaire. Par conséquent, plusieurs stratégies ont développées de contre ces effets Secondaires néfastes.

L'usage des liposomes, comme vecteurs des médicaments, est l'une de ces stratégies pour diminuer la toxicité des antibiotiques libres [11].

IV-5-Rifamycines :

Définition :

Sel monosodique de la Rifamycine SV, obtenue par transformation chimique de la Rifamycine B, elle-même élaborés par certaines souches *d'Amycolaropsis mediterranei*.

La Rifamycine SV peut également être produite directement à partir de certaines substances de *A. mediterranei*.

Activité au minimum 900 UI/mg (substance anhydre) [6].

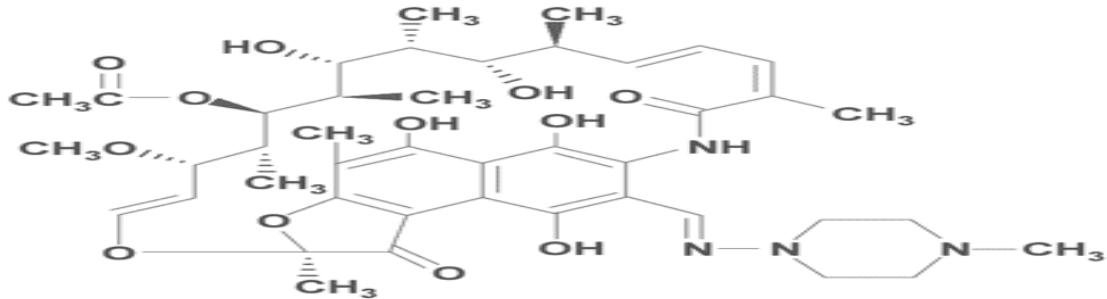
Caractères :

Aspect : poudre fine ou légèrement granulée, rouge.

Solubilité :

Soluble dans l'eau facilement soluble dans l'éthanol anhydre [6].

Structure chimique :



La Rifampicine est un antibiotique douée d'une bonne diffusion dans l'organisme et dans les cellules en dehors de son activité sur les mycobactéries, la Rifampicine est très active sur les coccis, on l'utilise parfois dans le traitement des infections à staphylocoques et dans la prévention des méningites à méninnella pneumophila et chamydiae. La Rifampicine peut sélectionner rapidement des mutants résistants lorsqu'elle est utilisée en monothérapie.

La Rifampicine est un puissant inducteur enzymatique qui peut accélérer le catabolisme de divers médicaments qui seraient administrés simultanément.

Les Rifamycines sont un groupe d'antibiotiques utilisés par les bactéries de la famille des actinomycètes

Les Rifamycines sont constituées d'un macrocycle et d'un cycle aromatique.

On distingue trois antibiotiques :

- La Rifamycine SV (Rifocine®),
- la Rifamide et,
- la Rifampicine.

Le nom de la rifampicine , un applicable Rifamycine oralement sur le marché.

Deux produits sont utilisés en thérapeutique : la Rifamycine SV et la Rifamycine. Elles sont actives sur les coccis à gram positif ou négatif ainsi que sur les bactéries à gram négatif (Brucella, Haemophilus, Bordetella, Legionella, Bactéroïdes, Fusobacterium). Les apparitions fréquentes de résistances chromosomiques font qu'on doit éviter de les employer seules [11].

Spectre d'activité :



La Rifamycine SV et la Rifampicine sont bactéricides ; elles ont une excellente activité sur les germes à Gram positif (staphylococcus et entérocoques).

La Rifamycine est particulièrement efficace contre mycobactéries, et sont donc employés pour traiter la tuberculose, lèpre, et complexe d'avium de mycobactérie Infections.

Mécanisme d'action

L'activité biologique des rifamycins se fonde sur l'inhibition de la synthèse ADN-dépendante d'ARN. C'est dû à l'affinité élevée des rifamycins de la polymérase prokaryotic d'ARN. Les données de structure en cristal de la limite d'antibiotique à la polymérase d'ARN indiquent que la rifamycine bloque la synthèse en causant des désaccords stériques forts avec de l'oligonucléotide croissant. Si la rifamycine lie la polymérase après que le processus à chaînes d'elongation ait commencé, on n'observe aucun effet sur la biosynthèse, qui est conformée à un modèle qui suggère que la rifamycine bloque physiquement l'elongation à chaînes. En outre, les rifamycins ont montré le pouvoir vers des tumeurs [12].

Effets indésirables

La rifampicine peut entraîner une coloration rouge des sécrétions comme l'urine, les crachats et le liquide lacrymal. Elle peut colorer de façon permanente les lentilles de contacts.

Des réactions à la rifampicine apparaissant lors des traitements quotidiens ou intermittents :

- Possibilité d'irritation transitoire,
- Risque de réaction d'hypersensibilité.



Chapitre 3 :

La sensibilité bactérienne de Spiramycine et Gentamycine



Le contrôle de l'activité thérapeutique des antibiotiques se fait par des tests de sensibilité bactérienne qui se détermine par l'antibiogramme, pour cela on va faire des dosages de l'activité biologique des antibiotiques périmés et non périmés (Spiramycine et Gentamycine).

V-L'étude de la sensibilité :

V-1 Matériel et méthodes :

Le matériel utilisé est celui dont on se sert souvent en microbiologie (Boites de pétri stériles, flacons de différents volumes, bain-marie, autoclave, hotte à flux laminaire, micropipettes de 200 μ l et 1000 μ l, plaques perforées en inox stériles, lecteur de zone, pied à coulisse pour mesurer les zones d'inhibition...).

Matière première :

Il s'agit de la matière première de l'antibiotique contrôlé qui est la spiramycine

Produit de référence :

Il s'agit des étalons de travail des deux substances chimiques contrôlés en l'occurrence la spiramycine et la gentamycine

Produits fini :

Il s'agit de la spiramycine et de la gentamycine dans leurs formulations finale c'est-à-dire avec ou sans excipients.



Souches bactériennes :

Des souches bactériennes de références ont été utilisées dans l'évaluation de l'activité antibactérienne ; Il s'agit de deux souches appartenant à des grandes collections de microorganismes :

- *Bacillus pumilus NCTC8241*
- *Bacillus subtilis NCTC 10400*

Solvant et diluants :

- Tampon phosphate :

On dissout dans 100 ml d'eau distillée (H_2O) un mélange 2,72 g de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) et 0,8 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et on ajuste le pH à 8.0 avec du H_3PO_4 (0.1 N) ou du NaOH (1 N)

- Solvant : méthanol (CH_3OH)

Milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé dans ce travail est le milieu gélosé Tryptocaséine Soja dont la composition est la suivante :

- Tryptone 15 g/l
 - Peptone papainique de soja 5 g/l
 - Agar milieu bactériologique 15 g/l
- Dissoudre 40 g du réactif dans un litre d'eau distillée ; le pH final doit être égale $7,3 \pm 0,2$ à 25°C.

Préparation des inoculums des deux souches :



Les suspensions de spores des microorganismes destinées à être utilisées comme inoculum sont préparées comme suit :

On cultive chaque microorganisme à 35-37°C pendant 7 jours, à la surface du milieu tryptocaséine soja additionné au préalable de 0.001 g/l de sulfate de manganèse. Avec de l'eau stérile, on enlève, par lavage ou grattage, la culture qui comprend principalement des spores. On chauffe la suspension à 70°C pendant 30 minutes et on dilue de façon à obtenir une concentration convenable de spores. Les suspensions de spores peuvent être conservées pendant une longue période à une température ne dépassant pas 4°C.

Préparation des différentes dilutions :

On prépare des solutions mères des deux antibiotiques utilisés ainsi que de leurs étalons de travail ou standard de référence (standard, matière première)

Antibiotique	Masse (en mg)	Solvant utilisé pour la préparation de la Solution mère	Volume de solvant (en ml)
Sulfate de Gentamycine (produit fini)	30	Tampon phosphate	30
Sulfate de Gentamycine (référence SCR)	30	Tampon phosphate	41,2
Spiramycine (matière première)	20,5	Méthanol	20
Spiramycine (référence SCR)	20,6	Méthanol	41

Réalisation des dilutions :

Spiramycine (matière première) : 100 µg/ml ; 50 µg/ml ; 25 µg/ml

Spiramycine (Standard SCR): 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml

Sulfate de Gentamicine (produit fini) : 100 µg/ml ; 50 µg/ml ; 25 µg/ml



Sulfate de Gentamycine (Standard SCR) : 100 µg/ml ; 50 µg/ml ; 25 µg/ml

Pour évaluer l'effet inhibiteur des différentes dilutions sur les deux souches bactériennes testées, les étapes suivantes sont utilisées:

 **Première étape :**

Après avoir préparé le milieu de culture et l'avoir stérilisé à l'autoclave, on le laisse refroidir au bain-marie à 45° C.

 **Deuxième étape :**

Une première couche (15 ml) est coulée dans des boîtes de Pétri posées sur une surface plane pour solidification.

 **Troisième étape :**

4 ml de l'une des deux suspensions bactériennes est additionnée à 100 ml de gélose (Agar Tryptocaséine Soja) refroidie au préalable à 45° C, puis l'ensemble est mélangé avec une agitation douce, puis 10 ml environ de ce mélange est coulé comme deuxième couche dans les boîtes de Pétri coulée au préalable.

 **Quatrième étape :**

On dépose des disques en acier inoxydables stériles sur la surface du milieu de culture gélosé solidifié.

 **Cinquième étape :**

Chaque disque est composé de six trous (5mm de diamètre) dans lesquels on dépose 50 µl ou 100µl des trois dilutions préparées pour chaque produit (gentamycine ou spiramycine) et de sa substance de référence, et ceci est valable pour les deux souches bactériennes (Bacillus pumilus pour la Gentamycine, et Bacillus subtilis pour la Spiramycine).



Les boites de pétri sont laissées sous hotte pendant 1 heure pour que l'antibiotique diffuse bien dans la gélose.

Enfin ces mêmes boites sont incubées à 37°C pendant 24 à 48h.

Pour chaque test on effectue deux essais et deux témoins [souches bactériennes et solvant utilisé].

V-2-Résultats et Discussion :

V-2-1-Dosage de l'activité biologique des 2 antibiotiques non périmés :

La lecture des résultats se fait en mesurant les zones d'inhibitions provoquées pour chaque dilution que ce soit pour la substance chimique de référence ou les échantillons à tester.

V-2-1-1 Spiramycine

Produit (concentration)	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml
Référence en mm	49	24	12,5
	48,5	24,2	12
Produit fini en mm	45	23	11
	47,5	23,5	11,8

Les résultats pour la concentration 100 µg/ml par majoration :

Produit	Concentration du produit 100 µg/ml		
Standard en mm	49	48	50
	48,5	48,4	48
Produit fini en mm	47	46	44
	47,5	47	47,2



Moyenne de la somme des trois résultats :

Produit	Concentration du produit 100 µg/ml
Standard en mm	49
	48,3
Produit fini en mm	45,6
	47,2

Moyenne de la somme des deux moyennes :

Produit	Concentration du produit 100 µg/ml
Standard en mm	48,65
Produit fini en mm	46,4

Sachant que l'activité du standard est : 4389 UI/ mg

En utilisant la règle de trois on obtient le résultat suivant :

4389 → 48,65

X → 46,4

X = 4186 UI / mg

Les résultats trouvés dans les tableaux qui représentent les diamètres en mm des zones d'inhibitions pour des concentrations qui varient des 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml nous donnent pour une concentration de 100 µg/ml une valeur moyenne pour le standard 48.65 mm et 46.4 mm pour le produit fini, Ces valeurs proches reflètent l'approche entre la concentration minimale inhibitrice 4389 UI/mg pour le standard et 4186 UI/mg pour le produit fini, Donc d'après les résultats obtenus on conclut que la Spiramycine produit fini est dans les normes.

V-2-1-2-Gentamicine :

Produit	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml



Standard en mm	13,56	17,40	9,45
	13,90	12,54	12,18
Produit fini en mm	15,27	15,08	10,66
	12,72	12,15	11,10

Les résultats pour 100 µg/ml :

Produit	Concentration du produit 100 µg/ml		
Standard en mm	13,56	34,8	37,8
	13,90	25,08	48,72
Produit fini en mm	15,27	30,16	42,64
	12,72	24,3	44,4

Somme des résultats :

Produit	Concentration du produit 100 µg/ml (somme des résultats)
Standard en mm	28,72
	29,23
Produit fini en mm	29,35
	27,14

Moyenne de la somme des deux moyennes :

Produit	Concentration du produit 100 µg/ml
Standard en mm	28,97
Produit fini en mm	28,25

En utilisant la règle de trois entre la moyenne de la référence et celle du produit à analyser en prenant comme norme la concentration du standard qui est de 40 mg/ml

28,25 → 40 mg/ml

28,977 → X



X = 39 mg/ml

Suivant la même procédure de Spiramycine, La Gentamicine donne à son tour pour une concentration de 100 µg/ml les mêmes concentrations minimales inhibitrices de 40 mg/ml pour le standard et 39 mg/ml pour le produit fini et ceci nous amène à dire qu'il est dans les normes (produit conforme).

V-2-2-Dosage de l'activité biologique des 2 antibiotiques périmés :

V-2-2-1 Spiramycine :

Le diamètre des zones d'inhibition ont toutes un diamètre qui sont d'environ 5 à 6 mm, ce qui, en réalité, correspond aux diamètres des trous des plaques en acier utilisées pour le test. En conclusion on pourrait déduire de ce résultat que les trois produits Spiramycine matière première, spiramycine standard de référence et spiramycine produit fini ne présentent aucune activité inhibitrice.

V-2-2-2-Gentamicine :

Après 24 à 48h d'incubation les zones d'inhibition provoquées par les antibiotiques et leurs standards de référence sont mesurées par un pied à coulisse électronique dans un lecteur de zone. Les résultats sont les suivants :

Remarque : on a travaillé avec un standard périmé.

Produit (concentration)	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml
Référence en mm	15	12	8
	15	12	10
Produit fini en mm	17	15	11
	18	15	11

Les résultats pour la concentration 100 µg/ml par majoration :

Produit	Concentration du produit 100 µg/ml		
Standard en mm	15	24	32
	15	24	40
Produit fini en mm	17	30	44
	18	30	44



Moyenne de la somme des trois résultats :

Produit	Concentration du produit
	100 µg/ml
Standard en mm	23,67
	26,33
Produit fini en mm	30,33
	30,67

Moyenne de la somme des deux moyennes :

Produit	Concentration du produit
	100 µg/ml
Standard en mm	25
Produit fini en mm	30,5

En utilisant la règle de trois on obtient le résultat suivant :

$$25 \rightarrow 100 \text{ µg/ml}$$

$$30,5 \rightarrow X$$

$$X = 122 \text{ µg/ml}$$

Le produit est présenté sous forme d'injection à 40mg/ml, donc :

100 correspond à 40 mg/ ml

122 correspond à X

$$X = 122 * 40 / 100$$

$$X = 48,8 \text{ mg/ml}$$

Les résultats trouvés nous donnent une concentration minimale inhibitrice de 146.4 mg/3ml pour le produit fini et 120 mg/3ml pour le produit dans les normes donc on peut déduire que la Gentamycine produit fini serait surdosée, ceci est expliqué par le standard qui est périmé.

Conclusion :



Les tests des dosages de l'activité biologique des antibiotiques périmés a montré qu'il n'y a aucune activité inhibitrice pour la Spiramycine périmé et un surdosage pour la Gentamycine périmé, donc l'explication de l'inactivité proviennent de la dégradation du principe actif qui est la molécule douée d'activité biologique, **reste à le confirmer par la méthode HPLC.**

Chapitre 4 : **Le dosage des antibiotiques** **par la méthode HPLC**



VI-Dosage du principe actif par HPLC :

L'identification par HPLC consiste à comparer les temps de rétentions entre la matière première et la substance chimique de référence lors du dosage du principe actif selon la pharmacopée européenne.

VI-1-Dosage de la Spiramycine périmée par HPLC :

Les conditions chromatographiques :

Colonne :

- (chromolith (R) performance RP-18 e 100_4,6 mm), Dimensions : l= 0,25 m ; ϕ = 4,6 mm,

Phase mobile : on a mélangé 100 ml de la solution tampon avec 1100 ml d'eau distillée et 800 ml d'acétonitrile.

Solution Tampon : on a préparé 34,8 g de phosphate dipotassique dans 1 litre d'eau distillée ajustée à PH=6,5 avec une solution de phosphate monopotassique à 27,2 g dans 1 litre d'eau distillée.

Débit : 1,0 ml/min

Détection : spectrophotomètre à 232 nm

Injection : 20 μ l de solution à blanc, de solution à examiner et solution substance chimique de référence.

- Température : 70 °C

Enregistrement : 3 fois le temps de rétention de la spiramycine 1.

Solvant de dilution : méthanol R, eau R (3:7 V /V).

Solution à blanc : méthanol R, eau R (3:7 V /V).

Préparation de la solution standard :

On dissout une quantité de 25mg de la substance chimique de référence SCR dans le solvant de dilution et on complète à 25 ml avec le même solvant.

Préparation de l'échantillon :

On prépare deux échantillons de la matière première de spiramycine de la même façon que la préparation du standard dont :

- MP1 = 25,1 mg.
- MP2 = 25.3 mg.



VI-2-Résultats et discussions:

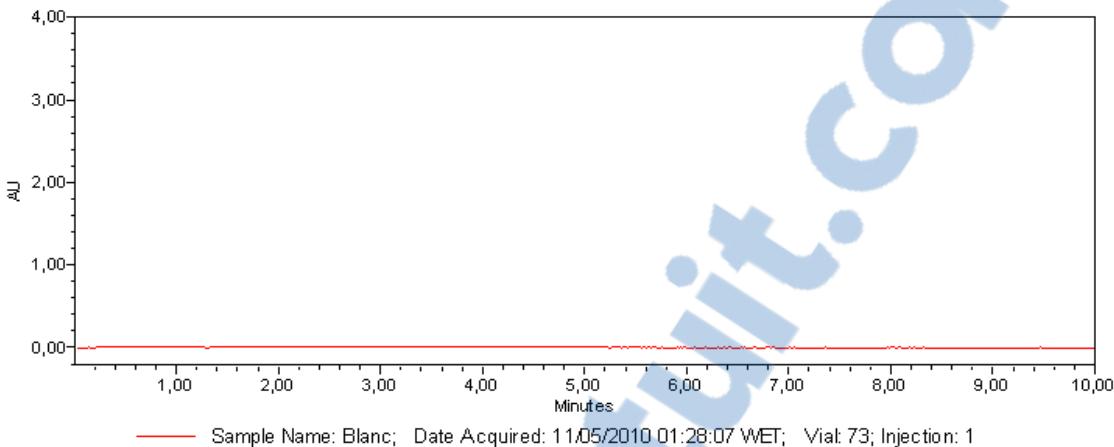


Figure 1 : Chromatogramme type de la solution du blanc

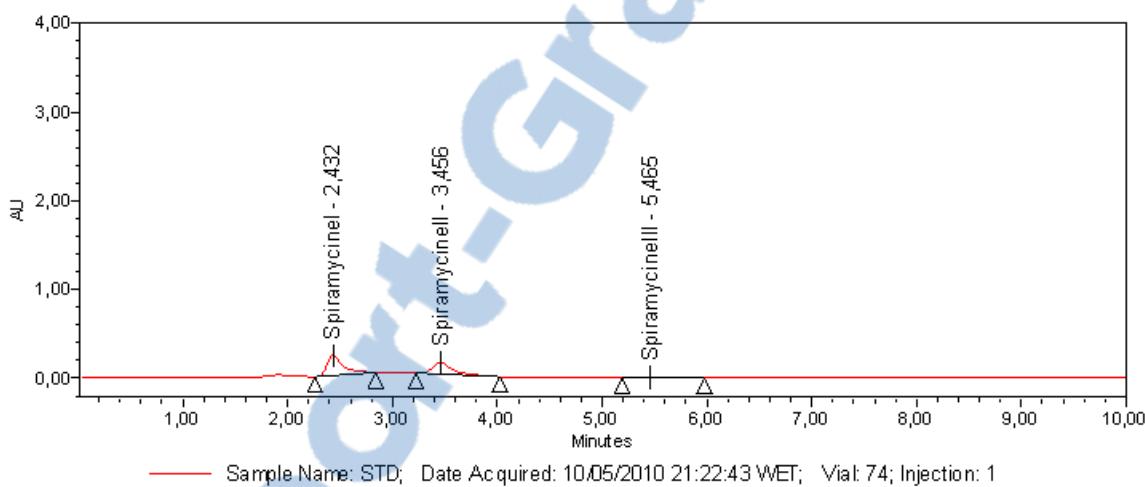


Figure 2 : Chromatogramme de Spiramycine (solution standard)

Peak Summary with Statistics

Name: Spiramycinel

	Sample Name	Vial	Irj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	STD	74	1	Spiramycinel	2,432	2458939	57,18	227917
Mean					2,432			
Std. Dev.								
% RSD								



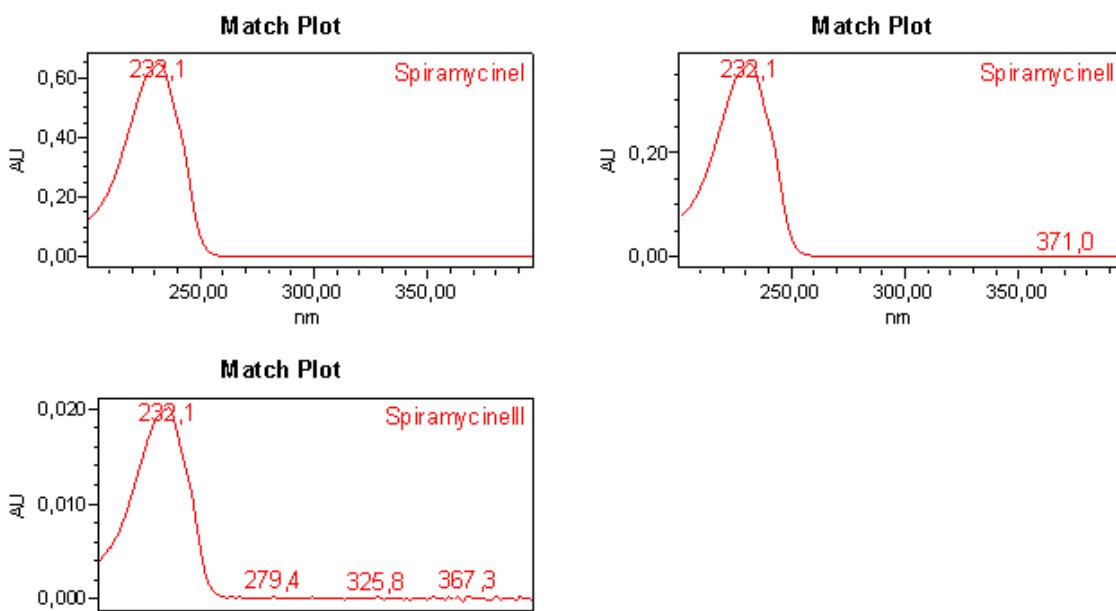
Peak Summary with Statistics
Name : Spiramycinell

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	STD	74	1	Spiramycinell	3,456	1715842	39,90	133743
Mean					3,456			
Std. Dev.								
% RSD								

Peak Summary with Statistics
Name : Spiramycinell

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	STD	74	1	Spiramycinell	5,465	125647	2,92	7254
Mean					5,465			

Les spectres UV du standard



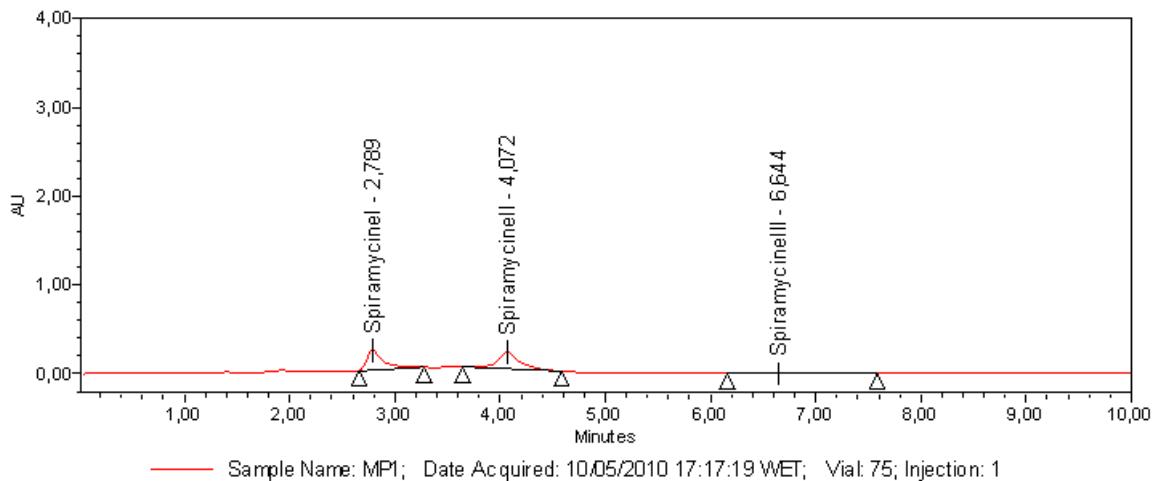


Figure 3 : Chromatogramme de Spiramycine (matière première)

Peak Summary with Statistics

Name: Spiramycinel

	Sample Name	Vial	Irj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	MP1	75	1	Spiramycinel	2,789	2539168	45,76	227964
Mean					2,789			
Std. Dev.								
% RSD								

Peak Summary with Statistics

Name : Spiramycinell

	Sample Name	Vial	Irj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	MP1	75	1	Spiramycinell	4,072	2795172	50,37	193559
Mean					4,072			
Std. Dev.								
% RSD								

Peak Summary with Statistics

Name: Spiramycinell

	Sample Name	Vial	Irj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	MP1	75	1	Spiramycinell	6,644	214706	3,87	10123
Mean					6,644			

Les spectres UV de la matière première:

Rapport-gratuit.com
LE NUMÉRO 1 MONDIAL DU MéMOIRES

Faculté des Sciences et Techniques - Fès

✉ B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☎ 212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

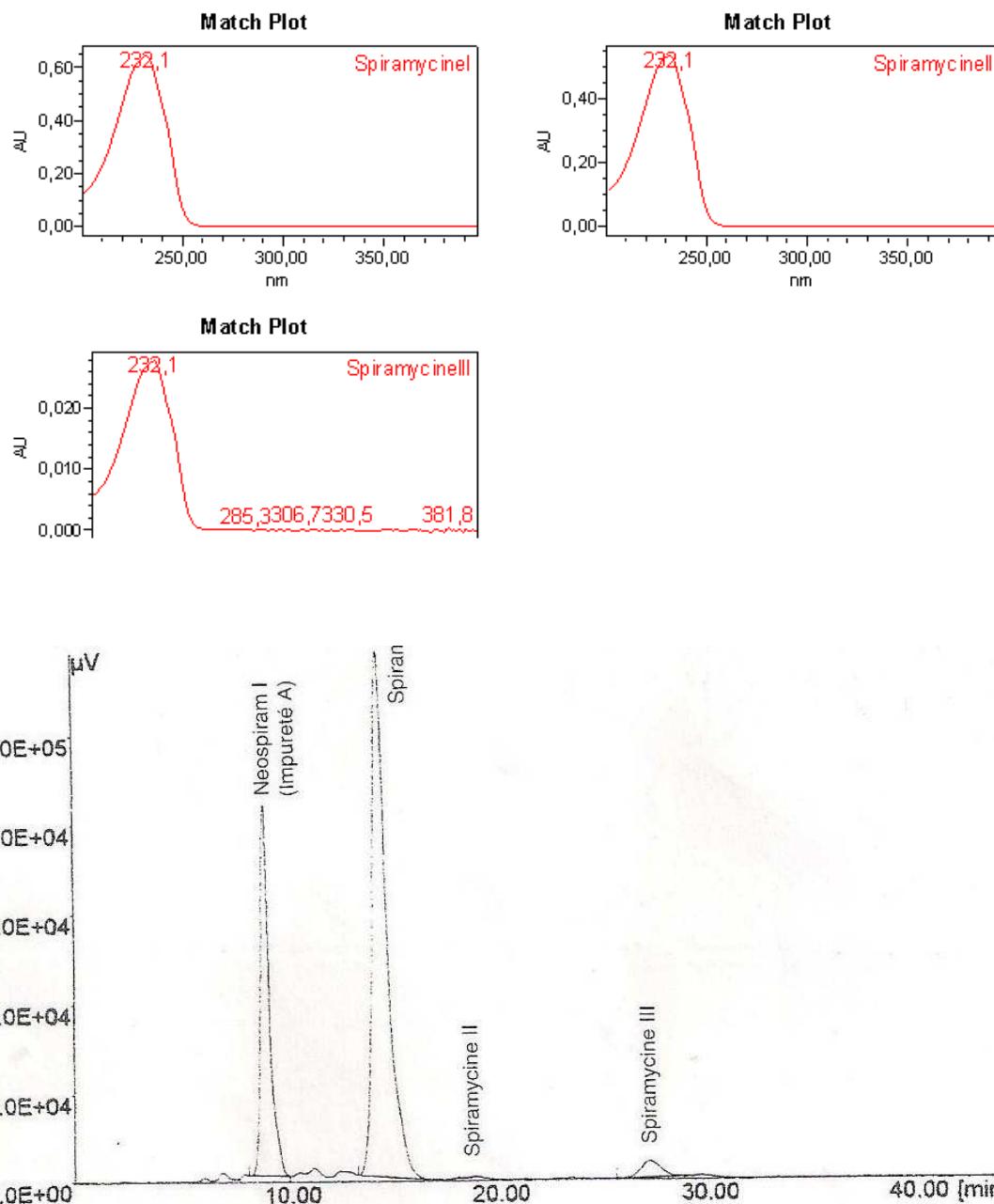


Figure 4 : Chromatogramme de Spiramycine (selon la pharmacopée européenne)

Le chromatogramme de spiramycine (matière première) selon le dosage par HPLC représentés par la Figure 3 montre la présence de la spiramycine sous ses trois formes (spiramycine I, II et III) dont les proportions suivantes 45,76% ; 50,37% et 3,87%, alors que le chromatogramme



de la spiramycine selon la pharmacopée européenne 4ème édition (voir Figure 4) montre que la forme I est majoritaire (la forme active) qui est responsable de l'activité biologique, ceci peut être expliqué par dégradation de la spiramycine forme I sous une autre forme.

Conclusion :

Le résultat trouvé du dosage de principe actif (Spiramycine) par la méthode HPLC, en tant que méthode quantitative et qualitative des séparations d'un mélange montre que notre échantillon est dégradé, cela nous donne l'idée de la relation entre la concentration en principe actif et l'activité biologique.

VI-3-Dosage de la Gentamicine par HPLC :

✚ Les conditions chromatographiques :

Colonne :Zorbax C18 5 μ m ; dimensions : l= 0,25 m ; ϕ = 4,6 mm,

Phase mobile : On dissolve 5,5 g d'heptane sulfonate de sodium dans un mélange de 50 ml d'acide acétique glacial, de 250 ml d'eau et 700 ml de méthanol.

Débit : 1,5 ml/min

Détection : spectrophotomètre à 230 nm

Injection : 10 μ l de solution à blanc, de solution à examiner et solution substance chimique de référence.

Température : 25 °C.

Solvant de dilution : l'eau distillée.

Solution à blanc : solvant

✚ Préparation de la solution standard :

On dissout une quantité de 92 mg de la substance chimique de référence SCR dans l'eau distillée et on complète dans une fiole de 10 ml avec le même solvant.

✚ Préparation de l'échantillon :

On a procédé par une prise d'essaie de 2ml dans une fiole de 20ml, le volume est ajusté par le solvant de dilution.



VI-4-Résultats et Discussions :

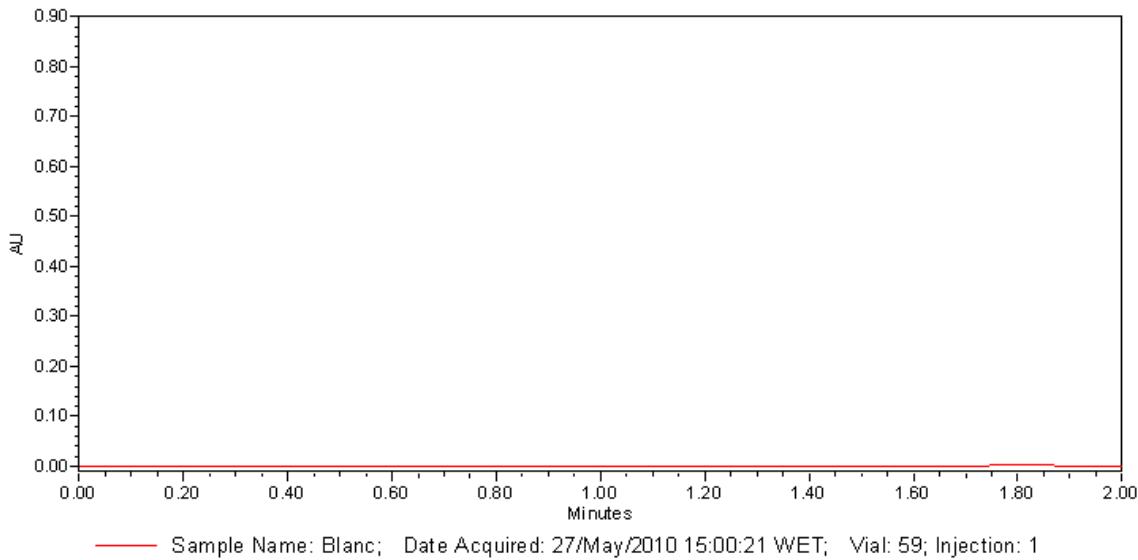


Figure 5 : Chromatogramme de Gentamicine (blanc)

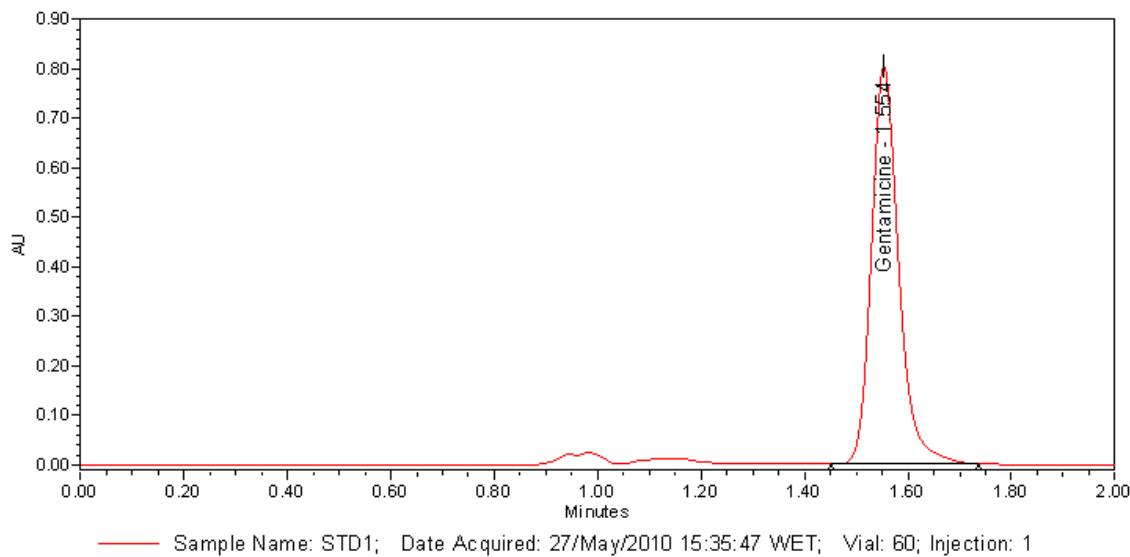
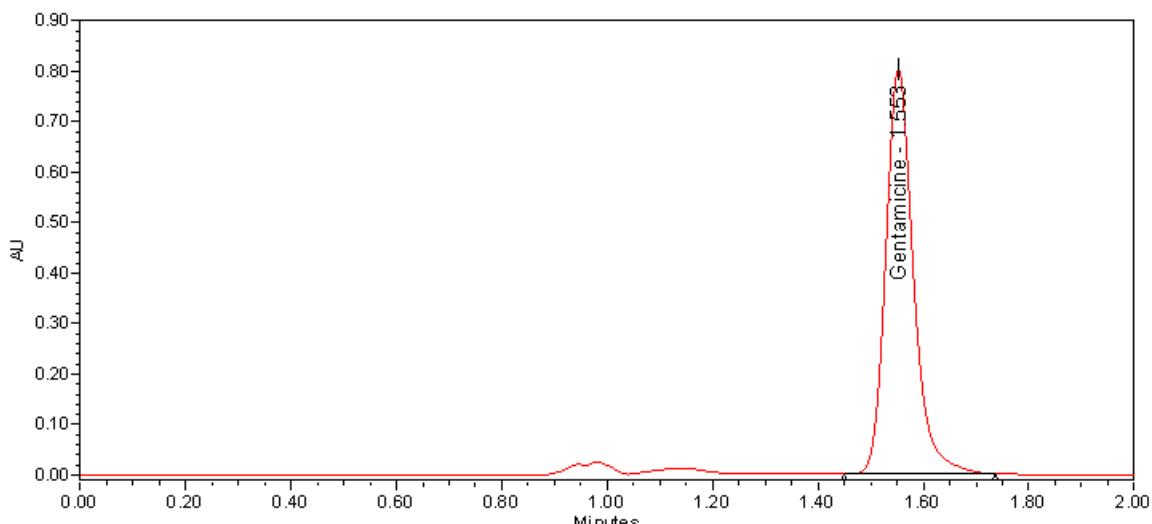
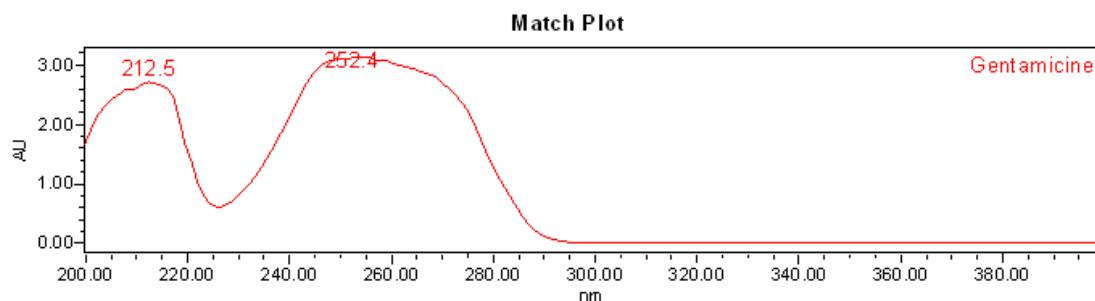


Figure 6 : Chromatogramme de Gentamicine (Standard 1)



Peak Summary with Statistics
Name: Gentamicine

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Purity Flag	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	STD1	60	1	Gentamicine	1.554	2935487	100.00	No	4.553861e+003	1.228978e+000
Mean					1.554					
Std. Dev.										
% RSD										



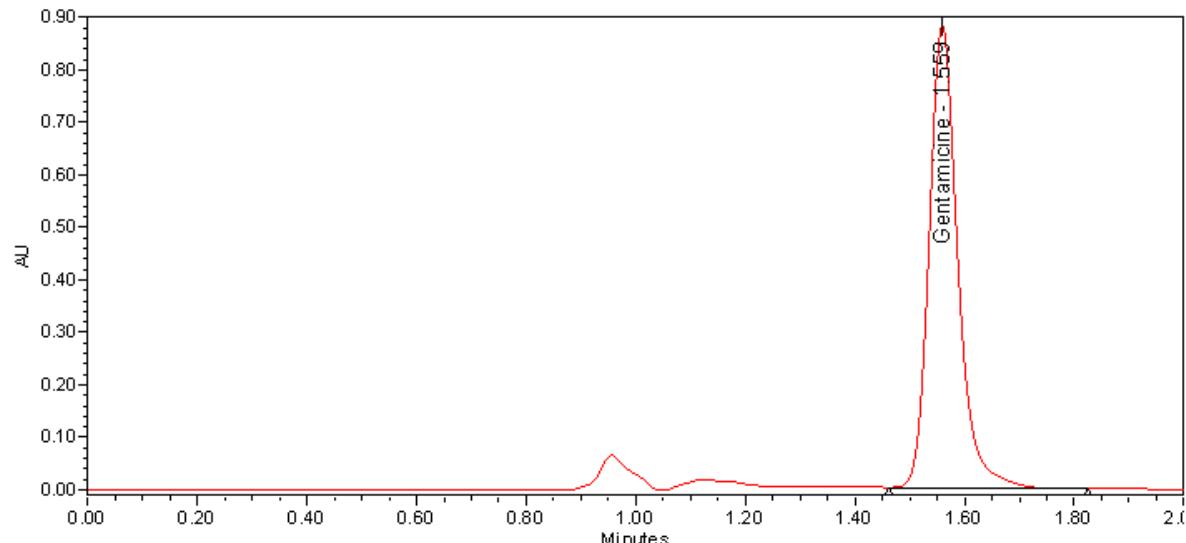
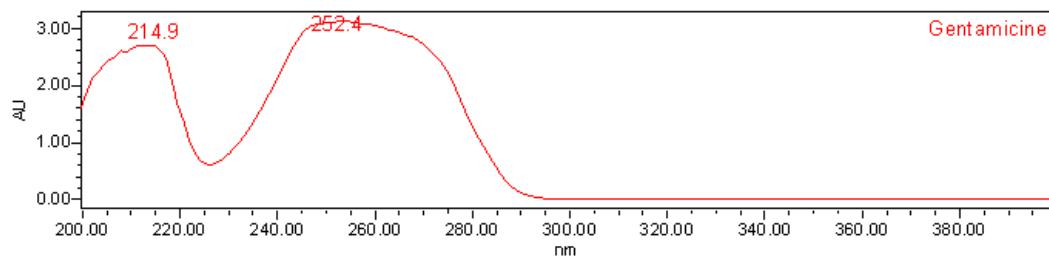
Sample Name: STD2; Date Acquired: 27/May/2010 15:54:46 WET; Vial: 63; Injection: 2

Figure 7 : Chromatogramme de Gentamicine (Standard 2)



Peak Summary with Statistics
Name: Gentamicine

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Purity1 Flag	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	STD2	63	2	Gentamicine	1.553	2922192	100.00	No	4.586553e+003	1.226908e+000
Mean					1.553					
Std. Dev.										
% RSD										



— Sample Name: E1; Date Acquired: 27/May/2010 16:13:41 WET; Vial: 61; Injection: 1

Figure 8: Chromatogramme de Gentamicine (Essai 1)

Peak Summary with Statistics
Name: Gentamicine

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Purity1 Flag	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	E1	61	1	Gentamicine	1.559	3194628	100.00	No	4.702394e+003	1.245825e+000
Mean					1.559					
Std. Dev.										
% RSD										

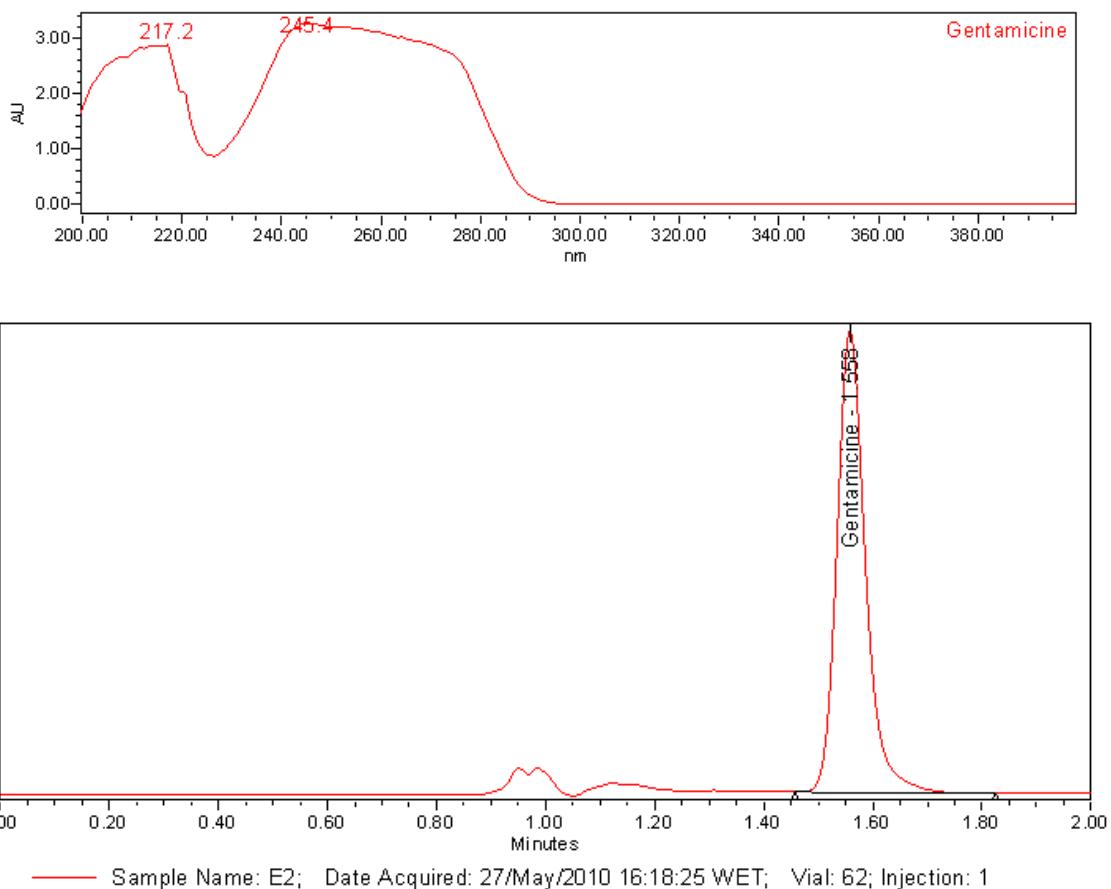


Figure 9: Chromatogramme de Gentamicine (Essai 2)

**Peak Summary with Statistics
Name: Gentamicine**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Purity Flag	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	E2	62	1	Gentamicine	1.558	3194506	100.00	No	4.699751e+003	1.245078e+000
Mean					1.558					
Std. Dev.										
% RSD										

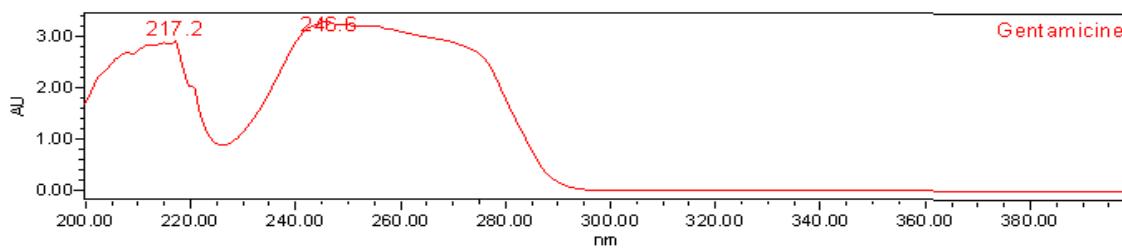




Tableau de calcul :

Principe actif	Gentamicine
Titre STD (%)	96
Teneur en eau STD (%)	0
Volume de dilution STD ml	10
Volume de dilution essai ml	10
Poids moyen (mg)	100000
Facteur de conversion	1

	Masse (g)	AIRE	F.R	T (mg/unité)	T (%)	F.R %
talon 1	0,092	2912505	31657663			
essai 1	2	3197926,5		48,488	121,22	99,20%
talon 1	0,092	2935487	31907467			
essai 2	2	3194551		48,057	120,14	100,40%
Moyenne				48,2725	120,68	
			Ecartype	0,538		
			CV trouvé (%)	0,45		
			CV limite DT(%)	2,5		

Théorie %	100	
Erreur maximum tolérée	5	%
Limite inférieure	38	95
Limite supérieure	42	105
Teneur (mg/unité)		120,68



Résultat:

Hors normes

Le résultat du dosage de Gentamicine par HPLC en utilisant le standard périmé montre que l'essai est surdosé 120,68% (144,81 mg/3ml) alors que le dosage du même essai avec un standard non périmé donne un résultat conforme. Ceci peut être expliqué par la dégradation de standard qui est responsable de surdosage (Résultat hors norme).

Conclusion :

Ce résultat est en concordance avec les tests biologiques qui montrent que notre échantillon est surdosé.

VII-Rifamycine :

VII-1-Dosage de la Rifamycine par UV :

✚ Réactifs :

- Sodium phosphate monobasique monohydrates (NaH_2PO_4 , H_2O)
- Sodium phosphate bibasique dodécahydrates ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

Solution Tampon phosphate à $\text{pH}=7,3$:

On dissout 2,28 g de (NaH_2PO_4 , H_2O) et 18,4 g de ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) dans un litre d'eau distillée (solvant).

✚ Matériel :

Spectrophotomètres UV (PERKIN ELMER ; lambda 35 UV /VISIBLE Spectrometer ; logiciel : Winlab)

La solution présente un maximum d'absorption à 445 nm.
(Méthode interne)

✚ Préparation de la solution standard :



On dissout une quantité de 21,5mg de la substance chimique de référence SCR (Rifamycine) dans la solution tampon phosphate à pH=7,3 (solvant) et on complète dans une fiole de 100 ml avec le même solvant.

 **Préparation de l'échantillon :**

On dissout une quantité de l'essai dans 50 ml de solvant dont :

$$E1 = 4,1500 \text{ g}$$

$$E2 = 4,4341 \text{ g}$$

 **Solution à blanc :**

est le tampon phosphate à pH=7,3

VII-2-Résultats et discussions :

Sample ID	Cyc	Factor	445,00	nm
STD	1	1,0000	0,0991	
STD	1	1,0000	0,0963	
Essai1	1	1,0000	0,1076	
Essai1	1	1,0000	0,1060	
Essai2	1	1,0000	0,1164	
Essai2	1	1,0000	0,1155	

Tableau de calcul :

Principe actif	Rifamycin
Titre STD (%)	90,35
Teneur en eau STD (%)	0
Volume de dilution STD ml	100
Volume de dilution essai ml	50



Poids moyen (mg)	100000
Facteur de coversion	1

	Massé (g)	Absorbance	F.R	T (mg/unité)	T (%)	F.R %
Etalon 1	0,0215	0,1	5			
Essai 1	4,15	0,11		255,84	102,34	100,00%
Etalon 1	0,0215	0,1	5			
Essai 2	4,4341	0,12		259,96	103,98	100,00%
Moyenne				257,9	103,16	
		Ecartype		0,82		
		CV trouvé (%)		0,8		
		CV limite DT(%)		2,5		

Théorie (mg/unité)	250	
Erreur maximum tolérée	5	%
Limite inférieure	237,5	95
Limite supérieure	262,5	105

Teneur (mg/unité)	257,92
--------------------------	---------------

Résultat:	Dans les normes
------------------	------------------------

On a constaté d'après le dosage de produit fini de Rifamycine avec la spectroscopie UV visible à une longueur d'onde de 445 nm (selon le protocole de la pharmacopée européenne) que notre produit est dans les normes avec une teneur de (103,19%) ce qui implique que le produit est conforme.

VII-3-Dosage de la Rifamycine par HPLC :

 Les conditions chromatographiques :

Rapport-gratuit.com
LE NUMÉRO 1 MONDIAL DU MéMOIRES



Colonne :

- Hypersil C18-5µm ; dimensions : l= 0,25 m ; ϕ = 4,6 mm,

Phase mobile

- Phase mobile A : On mélange 100 ml d'acétonitrile et 900 ml d'une solution préparé par 3,9 g de phosphate monosidique dans 1 litre d'eau distillée ajustée à PH=7,5 avec la solution diluée d'hydroxyde de sodium
- Phase mobile B : On mélange 300 ml d'une solution préparé par 3,9 g de phosphate monosidique dans 1 litre d'eau distillée ajustée à PH=7,5 avec la solution diluée d'hydroxyde de sodium et 700 ml d'acétonitrile.

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent V/V)	Phase mobile B (pour cent V/V)
0-40	80→20	20→80
40-45	20	80
45-47	20→80	80→20
47-55	80	20

Débit : 1,0 ml/min

Détection : spectrophotomètre à 254 nm

Injection : 20 µl de solution à blanc, de solution à examiner et solution substance chimique de référence.

Température : au minimum 20 °C.

Solvant de dilution : on mélange 500 ml d'une solution préparé par 3,9 g de phosphate monosidique dans 1 litre d'eau distillée ajustée à PH=3,0 avec une solution de l'acide phosphorique et 500 ml d'acétonitrile.

Solution à blanc : solvant.

Préparation de la solution standard :

On dissout une quantité de 0,0155 g de la substance chimique de référence SCR dans le mélange de solvant et on complète dans une fiole de 100 ml avec le même solvant.

Préparation de l'échantillon :

On dissout une quantité de produit fini dans 50 ml de solvant dont :

$$E1 = 4,1439 \text{ mg}$$



E2 = 4.0341 mg

VII-4-Résultats et Discussions :

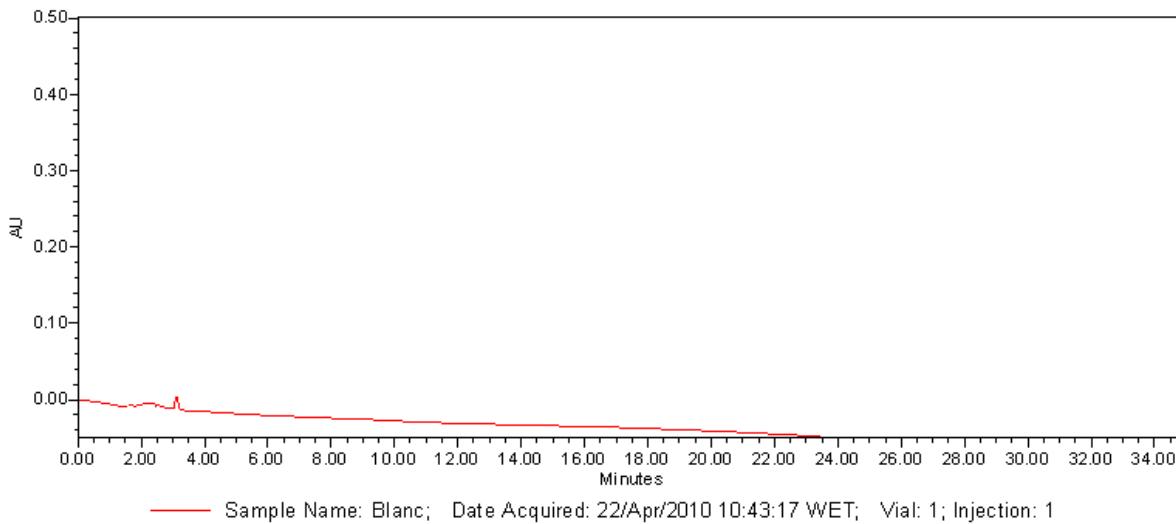


Figure 10 : Chromatogramme de Rifamycine la solution blanc

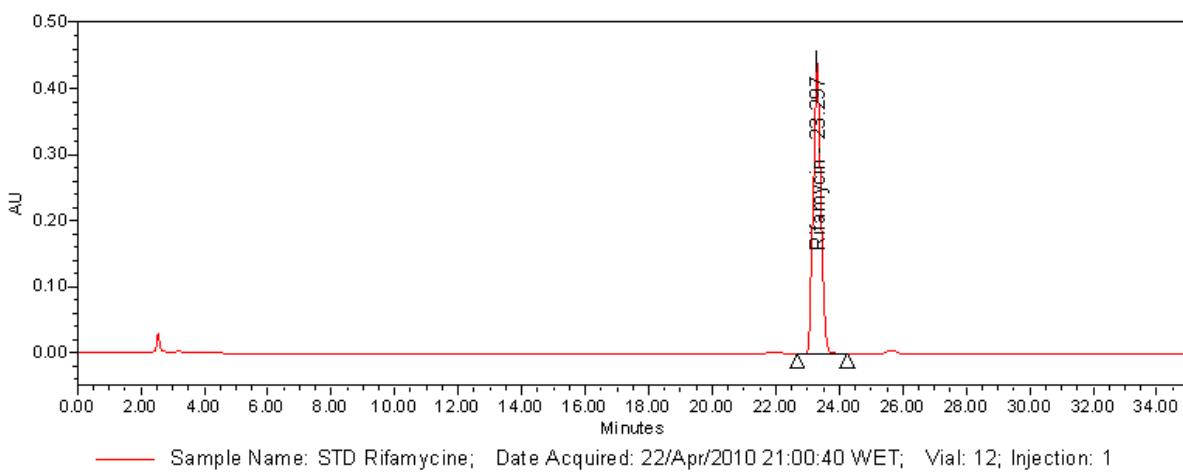


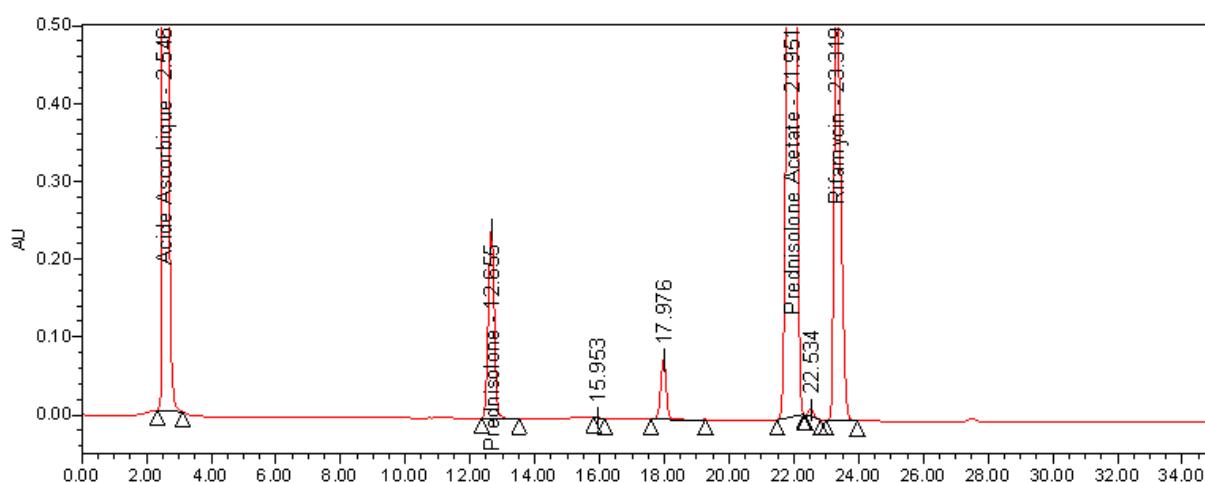
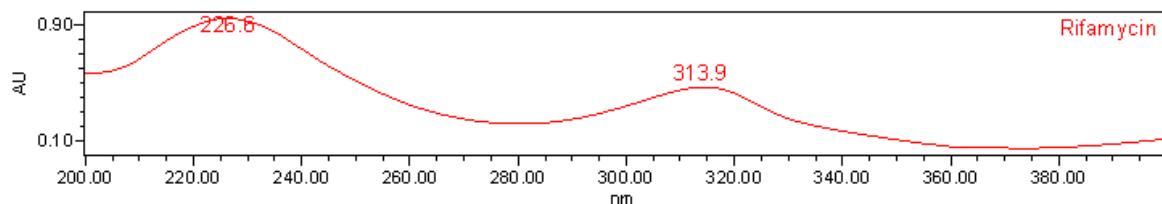
Figure11 : Chromatogramme de Rifamycine (solution standard)



Peak Summary with Statistics
Name: Rifamycin

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	STD Rifamycin	12	1	Rifamycin	23.297	7273078	100.00	47106.691488	1.095531
Mean					23.297				
Std. Dev.									
% RSD									

Match Plot



Sample Name: E1-L-14-1; Date Acquired: 22/Apr/2010 13:32:07 WET; Vial: 4; Injection: 1

Figure 12 : Chromatogramme de Rifamycine (Essai 1)



Peak Summary with Statistics
Name: Rifamycin

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Resolution
1	E1-L-14-1	4	1	Rifamycin	23.319	8098004	10.03	63871.484685	1.482285	2.221650e+000
Mean					23.319					
Std. Dev.										
% RSD										

Peak Summary with Statistics
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Resolution
1	E1-L-14-1	4	1	15.953	5584	0.01	35039.590979	1.085209	9.634372e+000
2	E1-L-14-1	4	1	22.534	114857	0.14	70816.975160	1.148430	1.600322e+000
3	E1-L-14-1	4	1	17.976	926462	1.15	52727.074810	0.964422	6.202816e+000
Mean				18.821					
Std. Dev.				3.371					
% RSD				17.91					

Les spectres UV de l'essai 1 :

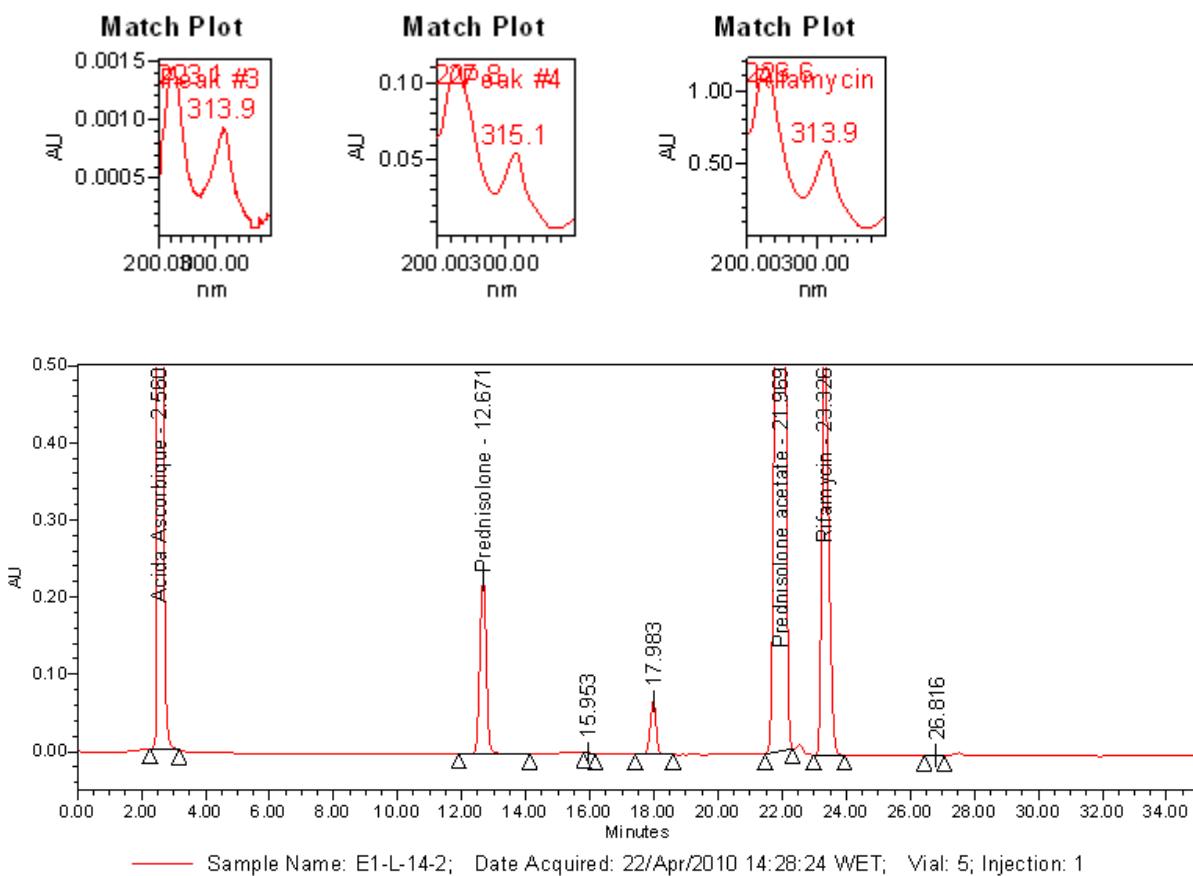


Figure 13 : Chromatogramme de Rifamycine (Essai 2)



Peak Summary with Statistics
Name: Rifamycin

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Resolution
1	E1-L-14-2	5	1	Rifamycin	23.326	7843274	9.94	61219.482374	1.344033	3.352299e+000
Mean					23.326					
Std. Dev.										
% RSD										

Peak Summary with Statistics
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count	Symmetry Factor	Resolution
1	E1-L-14-2	5	1	26.816	7611	0.01	31398.226475	0.853140	7.122699e+000
2	E1-L-14-2	5	1	15.953	4687	0.01	79990.446258	1.129376	1.096524e+001
3	E1-L-14-2	5	1	17.983	888670	1.13	44876.856325	0.934752	7.202678e+000
Mean				20.251					
Std. Dev.				5.776					
% RSD				28.52					

Les spectres UV de l'essai 2:

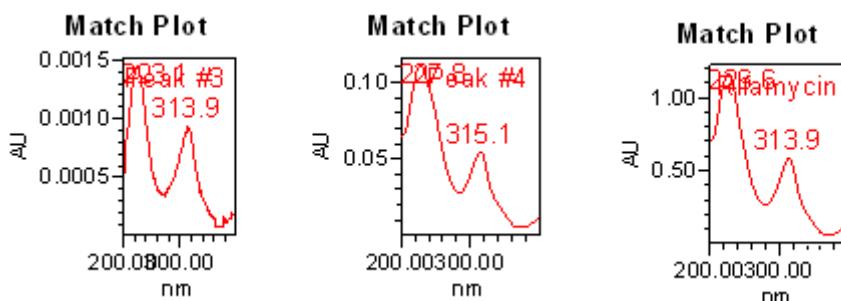


Tableau de calcul :

Principe actif	Rifamycin
Titre STD (%)	90,35
Teneur en eau STD (%)	0
Volume de dilution STD ml	100
Volume de dilution essai ml	50
Poids moyen (mg)	100000
Facteur de conversion	1



	Théorie (mg/unité)		250			T (%)	F.R %
	Erreur (g) maximum	AIRE	F.R	T (mg/unité)			
Etalon 1	0,0155	7273078	469230839	5	%		
Essai 1	4,1439	8097369		237,5	188,12 95	75,25	100,00%
Etalon 1	0,0155	7273078	469230839	262,5	105		
Essai 2	4,0341	Teneur (mg/unité)		187,88,12		74,87	100,00%
Moyenne				188,12		75,06	
		Ecartype		0,19			
		CV trouvé (%)		0,25			
		CV limite DT(%)		2,5			

Résultat:

Hors normes

Le dosage de produit fini de Rifamycine avec HPLC a montré que sur le chromatogramme obtenu, il y avait deux pic de (temps de rétention $tr_1 = 17,983$ min et $tr_2 = 15,953$ min) qui sont des impuretés de la Rifamycine d'après leurs spectres UV qui sont identiques, donc notre produit est dégradé, ce qui explique la valeur de la teneur (75,06 %) qui est hors normes.

Conclusion

On peut conclure que le dosage de produit fini de Rifamycine par HPLC a montré que les résultats trouvés par le dosage avec spectroscopie UV visible sont erronées.



Conclusion

Notre travail sur la relation entre l'activité biologique et la teneur en principe actif dosé par HPLC de deux antibiotiques nous a amené aux résultats suivants :

Les chromatogrammes des dosages par HPLC des antibiotiques périmés (Gentamicine, Spiramycine) qui montrait la dégradation des pics du principe actif doués d'activité thérapeutiques s'est avéré inactif vis-à-vis des souches bactériennes de (Bacillus pimulis et Bacillus subtilis). Tandis que les antibiotiques non périmés dosés par HPLC ont donné des pics intenses dont les concentrations sont dans les normes, et ils ont montré une bonne activité biologique.

Nos résultats confirment notre hypothèse à savoir qu'il y a une relation entre la concentration du principe actif dosé par HPLC et l'activité biologique. Donc nous pouvons nous permettre par cette étude de déduire que la méthode HPLC peut être utilisée comme une méthode alternative et sélective pour avoir une idée sur l'activité biologique en connaissant la concentration en principe actif.

Cependant, il est difficile de conclure directement qu'elle est une méthode de substitution à la technique d'antibiogramme, car il est prouvé que les bactéries développent au fur et à mesure des résistances à des mêmes doses d'antibiotique.

Perspective :



- La validation de la méthode HPLC de ces trois antibiotiques (Spiramycine, Gentamycine et Rifamycine)
- Elargir les spectres d'études avec d'autres antibiotiques qui sont similaires pour bien confirmer notre hypothèse.

Références bibliographiques

- [1]. Source interne de LNCM.2007-2008, RABAT.
- [2]. Procédure d'utilisation des appareils du LNCM
- [3]. **ROBERT-DERNUET S.** "Antibiotiques et Antigrammes Vigot" Paris. Decarie Montréal;1995.
- [4]. **Taoufik Jamal**, "Précis de chimie thérapeutique", collection Medica, Edition copiste 522-526, 2007.
- [5]. **Abdennebi EH**, "Antibactériennes en médecine vétérinaire", 2006.
- [6]. pharmacopée Européenne, Edition 6.0.
- [7]. **Brisson-Noel A.** Trieu-Cuot P, Courvalin P, "Mechanism of action of Spiramycin and other macrolides", Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 22, Suppl.B: 13-23, 1988.
- [8]. **BROOK I.** "Pharmacocinétique clinique de la spiramycine".
Clin. Pharmacokinet, 34 (4): 303-310, 1998.



-
- [9].**Barragry TB**, "Veterinary drug therapy". Lea & Febiger, Phila delphia USA, 1994.
 - [10].**Paul Shears, T.Hart** "Atlas de poche de microbiologie", 1ere édition, Flammarion, 1997
 - [11].**Maurice Moulin, Antoine Coquerel** - "Pharmacologie" 2002 - 845 pages
 - [12]. **Yves Cohen, Christian Jacquot** - "Pharmacologie" 2008 - 487 pages