

## LISTE DES ABREVIATIONS :

**LNCM** : Laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments

**HPLC** : chromatographie liquide à haut performance

**ICH** : international conférence on harmonisation

**DMP** : la direction des médicaments et de pharmacie

**ADSP** : l'Autorisation de débit des spécialités pharmaceutiques.

**OMS** : l'organisation mondiale de la santé

**USP** : United State Pharmacopée

**SCR** : substance chimie de référence

**OCDE** : Organisation de coopération et de développement économique

**CTD** : document technique commun

**SST** : système suitability test

**Rs** : la résolution

**$\alpha$**  : la sélectivité

**N<sub>th</sub>** : Nombre de plateaux Théoriques

**Fs** : Facteur de symétrie

**p/v** : rapport de pic-vallée

**PA** : Principe Actif

**LOD** : limite de détection

**LOQ** : limite de quantification

**HMWP** : les impuretés de haut poids moléculaire

**RSD** : relative standard deviation ou coefficient de variation

**STD** : standard

**IG** : insuline glargine

**FR** : facteur de réponse

## LISTES DES FIGURES :

Figure1 : Organigramme de la direction des médicaments et de la pharmacie.....	5
Figure 2: organigramme de service physico-chimique .....	6
Figure 3 : schéma de circuit des médicaments au sein de LNCM .....	7
Figure 4: l'équivalence entre un médicament princeps et générique .....	8
Figure 5: la structure de l'insuline humaine .....	14
Figure 6: la structure de l'Insuline Glargine .....	16
Figure 7: l'appareille de chromatographie liquide à haut performance .....	18
Figure 8: les constituons de chromatographie liquide à haut performance .....	20
Figure 9: injection avec boucle a) remplissage de la boucle, b) injection dans la colonne.....	21
Figure 10: colonne standard et pré-colonne de HPLC .....	21
Figure 11:Les grandeurs de calcul de nombre des plateaux théorique.....	23
Figure 12: calcul du facteur de résolution .....	24
Figure 13: Détermination du rapport pic-vallée .....	25
Figure 14: chromatogramme d'un pic asymétrique .....	25
Figure 15: chromatogramme de vérification de conformité du système.....	28
Figure 16: Chromatogramme de solution d'essai 1 à 276 nm.....	29
Figure 17: Chromatogramme de solution d'essai 2 à 276 nm.....	30
Figure 18: Chromatogramme de solution d'essai 3 à 276 nm.....	31
Figure 19: chromatogramme de six injections de solution standard .....	33
Figure 20: chromatogramme de solution d'essai 1 à 214 nm .....	34
Figure 21: chromatogramme de solution d'essai 2 à 214 nm .....	35
Figure 22: chromatogramme de solution d'essai 3 à 214 nm .....	36
Figure 23: chromatogramme de solution de référence .....	38
Figure 24 : chromatogramme de dosage des impuretés dans l'essai 1.....	38
Figure 25: chromatogramme de dosage des impuretés dans l'essai 2.....	39
Figure 26: chromatogramme de dosage des impuretés dans l'essai 3.....	39
Figure 27: chromatogramme d'Insuline Glargineet de 0 <sub>A</sub> -Arg-Insuline Glargineà215 nm.....	43
Figure 28: Chromatogramme du standard d'Insuline Glargineà 215 nm.....	44
Figure 29: chromatogramme de solution d'essai .....	46
Figure 30: chromatogramme du standard d'Insuline Glargineà 215nm.....	47
Figure 31: courbe d'étalonnage d'Insuline Glargine.....	47

## LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1: les conditions chromatographiques utilisé pour le dosage de HMWP .....	28
Tableau 2: résultats du rapport pic/vallée.....	29
Tableau 3: résultats d'essai 1 .....	29
Tableau 4: résultats de la solution d'essai 2 .....	30
Tableau 5: résultats de la solution d'essai 3 .....	31
Tableau 6: les normes de limite de détection et de limite de quantification .....	31
Tableau 7: les conditions chromatographiques du dosage de PA (l'Insuline Glargine) .....	32
Tableau 8: programme d'élution .....	32
Tableau 9: résultats de six injections de solution standard d'Insuline Glargine .....	33
Tableau 10: résultats d'injection de solution d'essai 1 .....	34
Tableau 11: résultats d'injection de solution d'essai 2.....	35
Tableau 12: résultats d'injection de solution d'essai 3.....	36
Tableau 13: résultats du dosage des impuretés en % .....	39
Tableau 14: standards de références.....	40
Tableau 15: programme d'élution .....	41
Tableau 16: conditions chromatographique utilisé pour le dosage du PA.....	42
Tableau 17: séquence des injections.....	42
Tableau 18: résultats d'injection du standard d'Insuline Glargine.....	44
Tableau 19: résultats de calcul de facteur de réponse .....	44
Tableau 20: résultat du dosage d'Insuline Glargine à 215 nm.....	46
Tableau 21: surface des pics des standards d'Insuline Glargine et leurs concentrations .....	47

# Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
------------------------------------	---

## **CHAPITRE 1 : PRESENTATION DU LABORATOIRE NATIONAL DE CONTROLE DES MEDICAMENTS**

I. Présentation de la direction du médicament et de la pharmacie (DMP) .....	3
1. Division de la Pharmacie : .....	3
Activité : .....	3
2. Division du Laboratoire National de contrôle des Médicaments.....	3
2.1 Identité juridique : .....	3
2.2 Présentation des activités du LNCM : .....	3
3. Structure de LNCM .....	4
3.1 Service physico-chimie : .....	5
3.2 Service des Essais Biologiques : .....	6
4. Circuit des médicaments au sein de la LNCM : .....	7

## **CHAPITRE 2: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

I. Généralité sur les médicaments : .....	8
1. Définitions d'un médicament : .....	8
2. Médicament princeps : .....	8
3. Médicament générique : .....	8
3. Biodisponibilité et bioéquivalence : .....	9
4. Composition d'un médicament : .....	9
5. Les types de médicaments : .....	9
6. Le contrôle de la qualité d'un médicament : .....	10
II. Analyse qualitative et quantitative : .....	11
III. Quelques Terminologies des médicaments : .....	11
1. Spécialité Pharmaceutique.....	11
2. Pharmacopée.....	11
3. La monographie : .....	11
4. Les substances de référence : .....	11
IV. Impuretés dans Les produits pharmaceutiques .....	12
V. Généralités sur l'insuline .....	14

1. Définition :	14
2. L'insuline humaine :	14
VI. Insuline Glargine :	15
1. Définition :	15
2. Structure d'Insuline Glargine.....	15
3. Mécanisme d'action .....	16
4. Contrôles Communs à toutes les insulines :	16
5. Stabilité et conditions de conservation des préparations d'insulines et analogues.....	17

### CHAPITRE 3: LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUT PERFORMANCE

I. Introduction :	18
1. Principe .....	18
2. Différents types de chromatographie liquide .....	19
II. L'appareillage :	20
1. Un ou plusieurs réservoirs de solvant .....	20
2. La pompe .....	20
3. Vanne d'injection.....	20
4. La colonne .....	21
5. La phase stationnaire .....	21
6. La phase mobile.....	22
7. Le dégazeur .....	22
8. Le Détecteur .....	22
9. Enregistreur.....	22
III. Les grandeurs caractérisant la qualité de séparation et la performance de la colonne.....	23
1. L'efficacité de la colonne .....	23
2. La résolution (R) :.....	24
3. La sélectivité:.....	24
IV. Conformité du système : système suitability (SST) : .....	24

### CHAPITRE 4: MATERIEL ET METHODE

I. Introduction :	27
<i>Partie 1 : Dosage de la première spécialité pharmaceutique .....</i>	<i>27</i>
I. Matériel et méthode :	27
1. Réactifs et solvant :	27
2. Appareillage :	27

II.	Dosage des impuretés de haut poids moléculaire(HMWP) :.....	27
	Préparation des solutions :.....	27
	2. Condition chromatographique :.....	28
	3. Conformité du système :.....	28
	4. Résultat et discussions : .....	29
III.	Dosage du principe active dans le produit fini :.....	33
	1. Préparation de la phase mobile :.....	33
	2. Préparation des solutions :.....	34
	3. Conformité du système :.....	34
	4. Critère d'acceptation :.....	37
	5. Résultats de calcul :.....	38
IV.	Dosage de substances apparentées :.....	38
	1. La conformité du système :.....	39
	<i>Partie 2 : Dosage d'Insuline Glargine dans la deuxième spécialité pharmaceutique.....</i>	
		41
I.	Le but :.....	41
II.	Matériels et méthodes :.....	41
	1. liste des réactives: .....	41
	2. Standards de référence :.....	41
	3. Préparation des solutions:.....	41
	4. Préparation des phases mobile .....	41
	5. Préparation des standards .....	42
	6. Solution d'essai :.....	42
	7. La conformité du système :.....	42
	8. Les conditions chromatographies : .....	43
	9. La séquence d'injection typique :.....	43
III.	Evaluation :.....	43
	1. Conformité du système :.....	43
	2. Resultats et discussion : .....	44
	3. Exigence de standard solution : .....	44
	4. La teneur en Insuline Glargine :.....	46
	5. la courbe d'étalonnage :.....	48
	6. Le calcule de teneur en Insuline Glargine: .....	49
	7. Discussions : .....	49
	8. Discussion des résultats :.....	49

**Rapport-Gratuit.com**





## INTRODUCTION :

L'industrie pharmaceutique est un secteur industriel chargé de la conception, la fabrication, le conditionnement et de la commercialisation des spécialités pharmaceutiques, pour la prévention et le traitement des maladies. Les spécialités pharmaceutiques destinées à l'homme doivent nécessairement, avant leur distribution, avoir reçu une autorisation de mise sur le marché des autorités compétentes (AMM).

Le laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM), est le seul organisme qui s'occupe de la délivrance de l'autorisation de mise sur le marché des médicaments. Il est chargé d'effectuer le contrôle de qualité des produits pharmaceutiques fabriqués localement ou importés, pour assurer et mettre à la disposition du malade un médicament sûr, de bonne qualité et présentant une innocuité et une efficacité acceptable, conforme aux normes internationales.

De nos jours, les industries pharmaceutiques sont entrées de plain-pied dans la mise au point de nouvelles générations de traitement, basées sur une véritable ingénierie du vivant. Il s'agit des médicaments biologiques. Le tout premier bio-médicament a été lancé en France en 1984, ce fut de l'insuline recombinante. Aujourd'hui, 75% de ces médicaments ont été lancés. Il y a moins de 10 ans, ils ont amélioré la qualité de vie de nombreux patients dont ceux atteints de certaines maladies spécifiques telles que le diabète, la sclérose en plaques, les cancers....

Depuis 1996, ont été commercialisées de nouvelles formes d'insuline ayant une séquence peptidique modifiée avec des propriétés pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques différentes. Des molécules ayant une activité pharmacodynamique conservée et un profil pharmacocinétique modifié ont été sélectionnées. Les analogues rapides (lispro, asparte et glulisine) ont une pharmacocinétique accélérée pour couvrir les besoins insuliniques au moment des repas. Les analogues lents (glargine et détémir) présentent un profil pharmacocinétique sans pic couvrant les besoins basaux en insuline tout au long du nyctémère [4].

La présence des impuretés dans un médicament joue un rôle important dans l'innocuité, la qualité et l'efficacité d'un médicament. Ainsi, le contrôle des impuretés dans les produits pharmaceutiques est l'objet d'une préoccupation essentielle des analystes de l'industrie pharmaceutique, et d'une attention particulière des autorités de santé [5].

Notre travail au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM), consiste à faire des contrôles de qualité des produits finis à base d'insuline Glargine par un dosage du principe actif et des impuretés de haut poids moléculaire, et des impuretés apparentées par la méthode d'HPLC, tout en se référant à la monographie en vigueur (annexe 1) et aux recommandations de l'ICH.

Le plan de notre mémoire comporte quatre chapitres :

- ✓ Chapitre 1 présente une généralité sur le Laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments et leur secteur d'activité.
- ✓ Chapitre 2 : concerne une étude bibliographie comportant des généralités sur les médicaments et l'Insuline Glargine ainsi que leurs propriétés physico-chimique, et les conditions de conservations.
- ✓ Chapitre 3 : présente une étude de la technique de chromatographie liquide à haut performance (HPLC).
- ✓ Chapitre 4 : sera consacré à la partie expérimentale qui inclue le matériel et méthode utilisés et le traitement des résultats obtenus lors de notre étude.

## I. Présentation de la direction du médicament et de la pharmacie (DMP)

La direction du médicament et de la pharmacie s'occupe des aspects organisationnels, législatifs, de contrôle et d'inspection. Elle a entamé sa réforme depuis quelques années. Elle a été créée dans l'organigramme fin décembre 1994 mais sa naissance effective date d'avril 1996 à la nomination d'un directeur. Elle est formée de deux divisions :

- ✓ La Division de la Pharmacie
- ✓ La Division du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments(LNCM)

### 1. Division de la Pharmacie :

#### 1.1 Missions :

- Fixer le cadre des prix des médicaments et des spécialités pharmaceutiques.
- Assurer le contrôle technique de qualité dans le cadre de la législation et de la réglementation en vigueur, en se basant sur les résultats des contrôles analytiques et documentaires fournis par le LNCM.
- Établir et mettre à jour la liste des médicaments essentiels et en assurer le contrôle de qualité. Coordonner, animer, encadrer et évaluer l'activité.
- Veiller à la formation continue des cadres et agents de la division.

#### 2.1 Activité :

- Assurer le suivi des relations de la division avec les autres entités (internes ou externes) du Ministère de la Santé et, en particulier, suivre le traitement du courrier de la division du LNCM.

### 2. Division du Laboratoire National de contrôle des Médicaments

#### 2.1 Identité juridique :

Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) du Ministère de la Santé est une division du Médicament et de la Pharmacie, créée en 1969. Il est régi par le Décret 2/72/374 du 24 Avril 1974.

#### 2.2 Présentation des activités du LNCM :

« Les déterminations analytiques et les essais que nécessite le contrôle des médicaments et des spécialités pharmaceutiques, dispositifs médicaux et tout autre article destiné à l'usage de la médecine humaine. Il se charge aussi de l'enseignement médico-pharmaceutique. »

Le contrôle du médicament s'effectue selon les modalités suivantes :

- **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 des inspecteurs pharmaciens qui sont chargés de visiter les laboratoires pharmaceutiques et les officines. 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<sup>er</sup> 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 sérums en vue de l'octroi d'un certificat de libération de lot.
- Les validations des procédés de fabrication et validations analytiques. En collaboration avec la Direction de la Normalisation et de la Promotion de la Qualité (Ministère du Commerce et de l'Industrie), le LNCM procède à l'élaboration des normes marocaines relatives aux contrôles des dispositifs médicaux et des articles de puériculture destinés à l'enfant de premier âge.

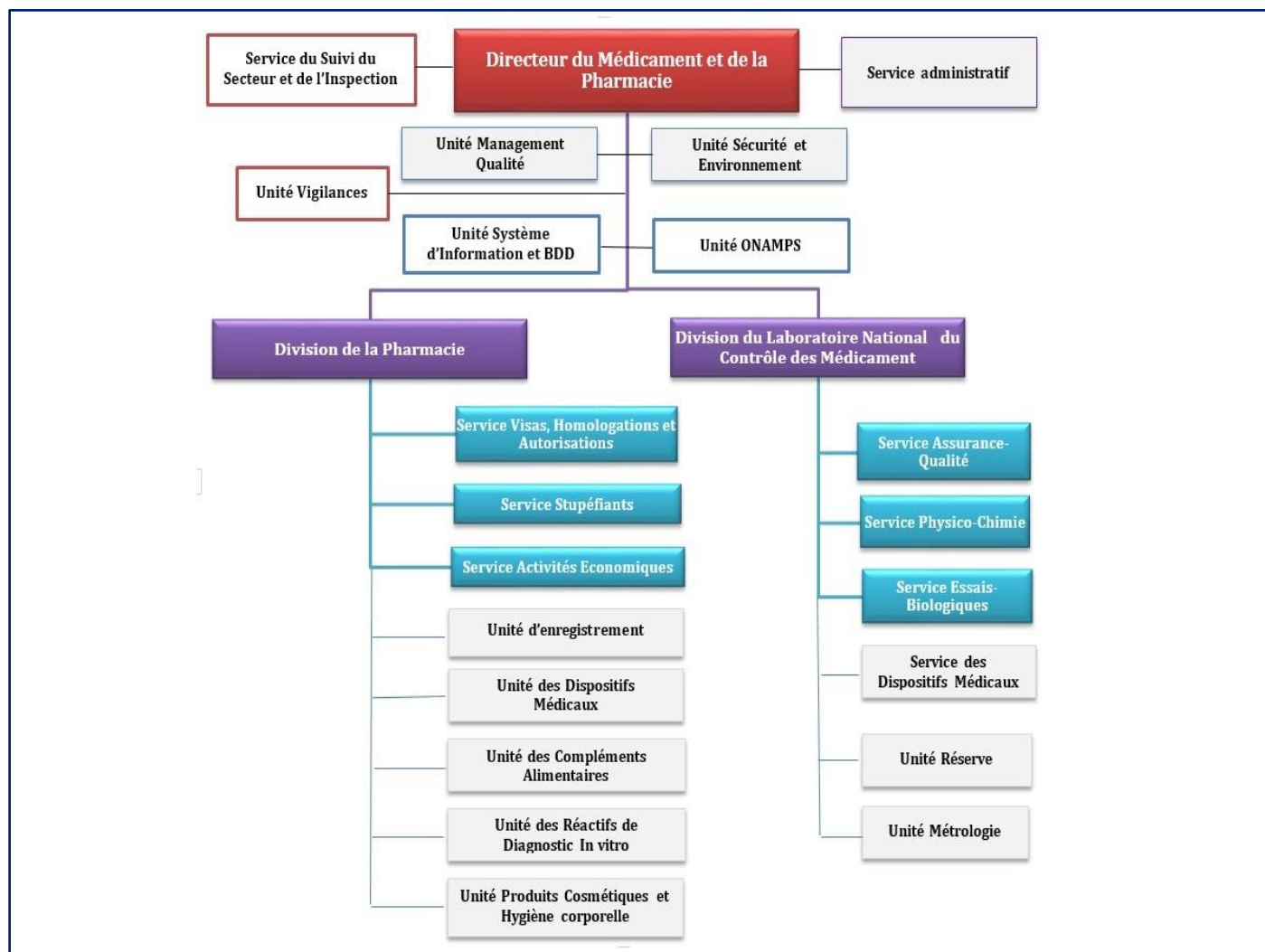
➤ Le LNCM est aussi :

- 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

### 3. Structure de LNCM

La Division du LNCM est organisée au sein de la Direction du Médicament et de la Pharmacie en services et unités:

- Service Physico-chimique**
- Service des Essais Biologiques**
- Service Assurance Qualité
- Service de Normalisation et Dispositifs Médicaux
- Unité Métrologie
- Unité de réserve
- Unité de sécurité et environnement.



**Figure 1: organigramme du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments**

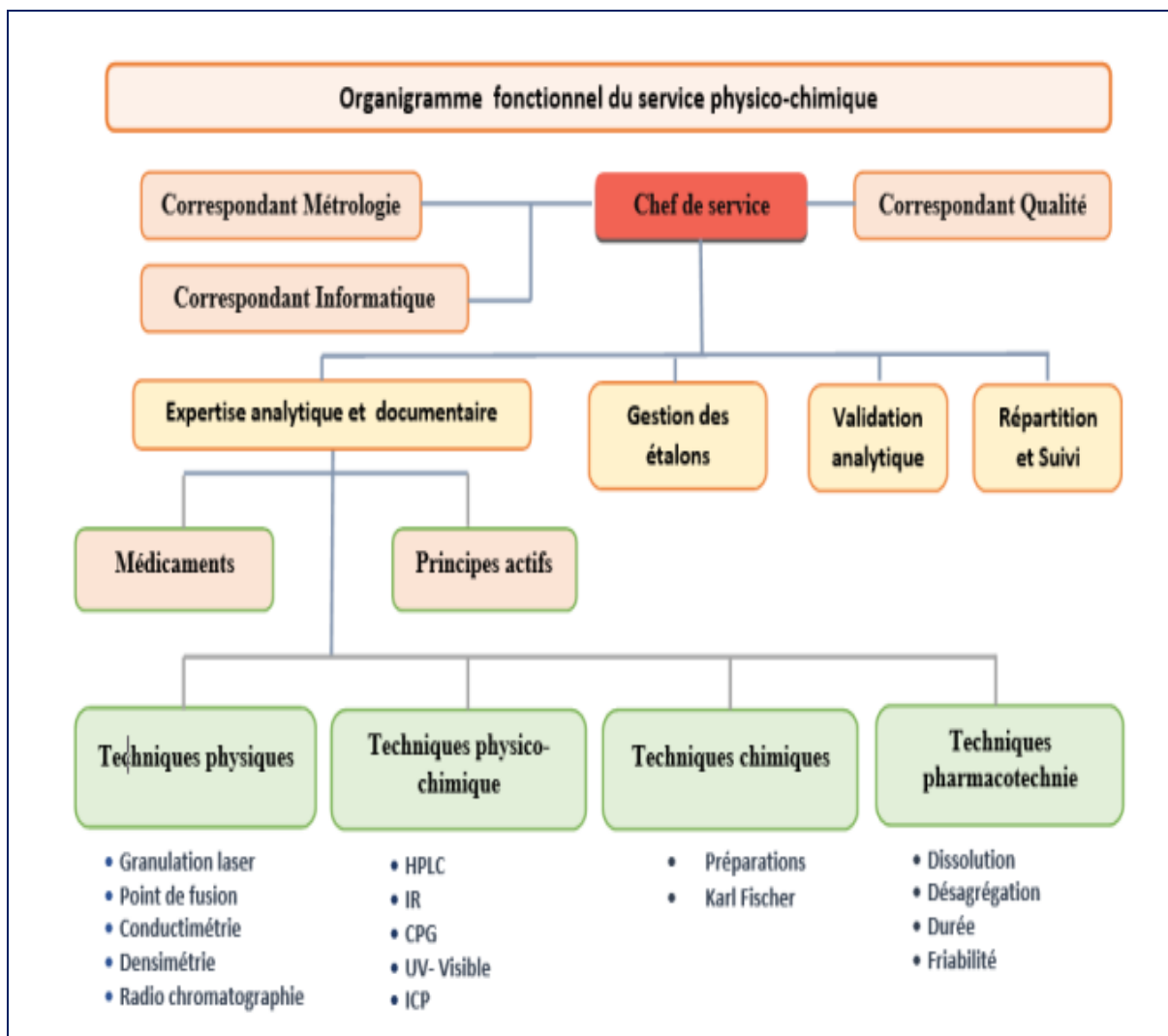
### 3.1 Service physico-chimie :

#### Mission :

Il a pour rôle de réaliser des contrôles physico-chimiques des médicaments, des dispositifs médicaux et des matières premières. Il vérifie si la dose du principe actif dans la spécialité pharmaceutique est la même que celle indiquée sur le produit fini. Cette étape nécessite l'utilisation, comme outils d'analyses, les méthodes galéniques, spectroscopiques, chromatographiques et chimiques, ainsi que des substances de références.

#### Activité:

- Réalisation des essais physico-chimiques et des tests galéniques et contrôle par rapport aux normes de qualité avec l'objectif de fournir une base scientifique à toute décision d'ordre technique, administratif ou juridique.
- Formuler les résultats des tests dans des procès verbaux, analyse des anomalies constatées et formulation des recommandations concernant les suites à donner.
- Constituer et gérer une base de données sur le médicament à l'échelle national et international.



**Figure 2: organigramme de service physico-chimique**

### 3.2 Service des Essais Biologiques :

#### **Mission:**

Le service des essais biologiques contrôle, sur le plan biologique, des médicaments et des spécialités pharmaceutiques, des objectifs de pansement et de tout autre article destiné à l'usage de la médecine humaine ainsi que des sérums et des vaccins.

#### **Activités :**

- Exécution des essais microbiologiques et pharmacodynamiques et contrôle par rapport aux normes de qualité avec l'objectif de fournir une base scientifique à toute décision d'ordre technique, administratif ou juridique.
- Formalisation des résultats des tests dans des procès-verbaux, analyse des anomalies constatées, et formulation de recommandation concernant les suites à donner.

#### 4. Circuit des médicaments au sein de la LNCM :

A l'arrivée au LNCM, les échantillons à analyser sont pris en charge par la cellule d'enregistrement, puis ils sont stockés, et répartis aux analystes sous la responsabilité des chefs des services, ces derniers doivent alors vérifier la faisabilité de leurs analyses respectives par consultation des bases de données suivantes :

- Demande d'analyse, dossier technique.
- Les bulletins d'analyse du produit fini, de la matière première et de la substance de référence.
- Substance de référence, produits et réactifs.

Si tous les critères sont réunis, l'analyste démarre au sein de chaque service. Les analystes doivent saisir les résultats des tests au fur et à mesure de leur exécution. Une fois les analyses contenues dans les dossiers techniques des médicaments sont complétés, les analystes éditent les bulletins d'analyse puis les soumettent à leurs chefs pour une raison quelconque jusqu'à l'obtention du résultat de conformité (figure2).

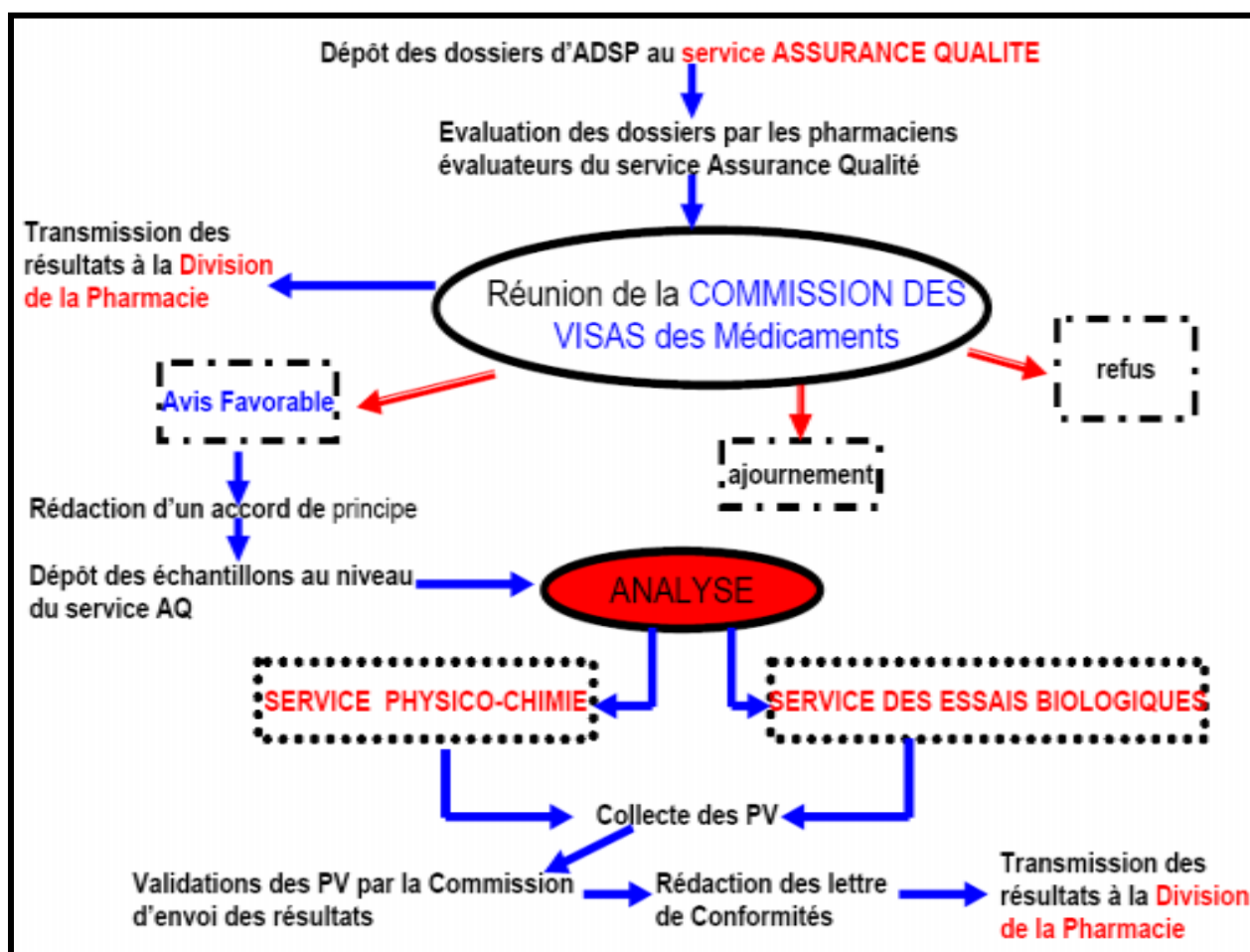


Figure 3: schéma de circuit des médicaments au sein du LNCM

## I. Généralité sur les médicaments :

### 1. Définitions d'un 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 » [6].

### 2. Médicament princeps :

Un médicament original ou princeps est un médicament découvert par un laboratoire qui en garde l'exclusivité. Après plusieurs années, d'autres laboratoires ont le droit de produire un médicament identique à ce princeps : fabriqué avec la même molécule, ce médicament est appelé générique.

### 3. Médicament générique :

(article 2.6 code du médicament et de la pharmacie Décembre 2006) : « La spécialité générique d'une spécialité de référence qui est considérée comme une spécialité qui a la même composition qualitative et quantitative en principes actifs et la même forme pharmaceutique que la spécialité de référence, et dont la bioéquivalence avec cette dernière a été démontrée par des études appropriées de biodisponibilité.

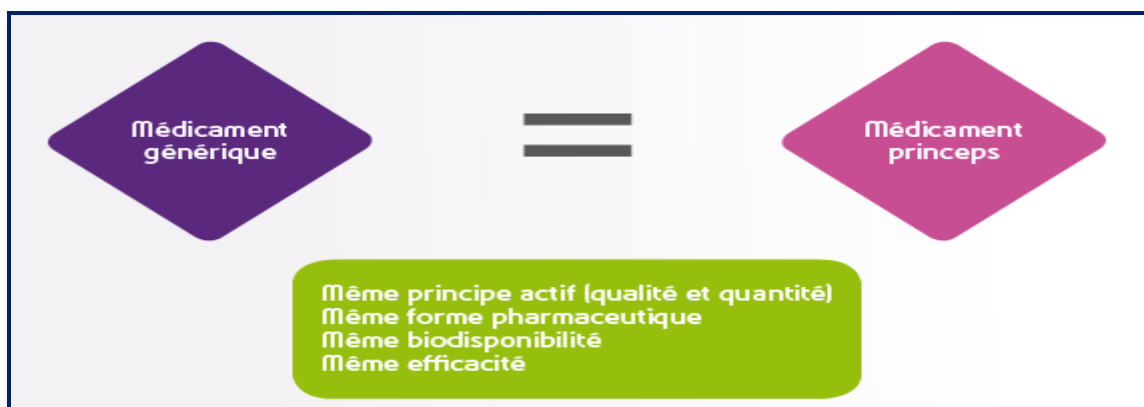


Figure 4: l'équivalence entre un médicament princeps et générique

Selon l'OMS les médicaments génériques sont « des produits dont l'exploitation ne fait l'objet d'aucun brevet soit qu'ils soient tombés dans le domaine public soit qu'aucun brevet n'a jamais été déposé » [7].

Le « médicament générique » est défini comme la copie d'un médicament innovant dont la production et la commercialisation ont été rendues possibles par l'expiration de son brevet de propriété industrielle.

Celui-ci assure l'exclusivité de la commercialisation du « princeps » pendant 20 ans et permet au laboratoire « inventeur » d'une nouvelle molécule d'amortir les coûts de recherche et de développement.



Ces médicaments doivent être des équivalents thérapeutiques aux produits princeps et sont de ce fait interchangeables. Ils présentent en outre un avantage économique. Le générique coûte moins cher, non parce qu'il est de moindre qualité, mais parce qu'il n'a pas supporté les frais de recherche et développement. Car la structure de la molécule est déjà connue, son efficacité et sa toxicité sont déjà prouvées par des études cliniques réalisées sur l'innovateur.

### **3. Biodisponibilité et bioéquivalence :**

La biodisponibilité décrit comment un principe actif devient disponible dans l'organisme pour produire son action biologique. Elle est caractérisée par la quantité de principe actif disponible (qui atteint la circulation sanguine) et la vitesse de ce processus [8].

La bioéquivalence entre deux médicaments signifie une équivalence de leur biodisponibilité. La démonstration de la bioéquivalence entre deux médicaments repose donc sur la comparaison de leurs biodisponibilités obtenues suite à l'administration d'une même dose de principe actif par une même voie d'administration [8].

### **4. Composition d'un médicament :**

Un médicament est constitué de Principe actif et d'excipient

#### **1.2 Principe actif :**

C'est une substance pharmacologique 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 [9].

#### **2.2 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 [9].

### **5. Les types de médicaments :**

On distingue trois types de médicaments : les médicaments chimiques, les médicaments biologiques, et les médicaments issus de la biotechnologie.

#### **1.5 Les médicaments chimiques :**

C'est un médicament dont le principe actif découle de la synthèse chimique, donc à partir de matière non vivante. Ce type de médicament est celui qui est le plus couramment utilisé actuellement [10].

#### **2.5 Les médicaments biologiques :**

Un médicament biologique selon la législation européenne, est un médicament qui contient un ou plusieurs principes actifs fabriqués par ou dérivés d'une source biologique.

Au sens large, les médicaments biologiques contiennent une substance fabriquée au laboratoire à partir d'un organisme vivant [10].

### 3.5 Les médicaments issus de la biotechnologie :

Selon la définition proposée par l'OCDE : « les biotechnologies sont l'application de la science et de la technologie à des organismes vivants, de même qu'à ses composantes, produits et modélisations, pour modifier des matériaux vivants ou non vivants aux fins de la production de connaissances, de biens et de services ». [11].

### 6. Le contrôle de la qualité d'un médicament :

En se référant aux pharmacopées, il se dégage que les caractéristiques les plus importantes pour établir la qualité d'un médicament sont : l'identité, la pureté, l'activité, l'uniformité, la biodisponibilité et la date de péremption.

En ce qui concerne l'**identité** des constituants du médicament, le principe actif, l'excipient et l'adjuvant déclaré doivent être présents dans le produit. De même la forme pharmaceutique doit correspondre à ce qui est annoncé sur l'emballage [12].

Quand à la **pureté**, en dehors des principes actifs, les excipients et les adjuvants, les médicaments ne doivent pas contenir de substance potentiellement toxique. Ces dernières peuvent provenir du processus d'obtention du principe actif ou excipient, de mauvaises conditions de conservation pouvant donner naissance aux produits de dégradations inactives ou nocives [12].

L'**activité** du médicament est due au principe actif qu'il contient. Le principe actif du médicament doit avoir une action thérapeutique confirmée à celle déclarée sur l'étiquette du produit. Lorsque le médicament contient plusieurs principes actifs, cette information doit être mentionnée sur l'emballage [12].

La **qualité** d'un médicament peut être aussi évaluée par l'uniformité de la forme pharmaceutique. En effet la couleur, la taille, le poids et la forme du médicament ne doivent pas varier dans un même lot ou d'un lot à l'autre [12].

La **biodisponibilité** est représentée par la mesure de la fraction d'une dose administrée d'un médicament qui atteint effectivement la circulation générale et la vitesse avec laquelle le médicament parvient dans la circulation. C'est un paramètre extrêmement important qui permet de comparer deux médicaments contenant le même principe actif en prenant un d'entre eux comme référence [12].

La **date de péremption** est une caractéristique importante et égale qui doit figurer de façon explicite sur tout médicament. C'est une date au-delà de laquelle le fabricant ne garantit plus l'efficacité et l'innocuité du médicament et décline toute responsabilité en cas d'effets non attendus, indésirables ou dangereux survenus lors de l'utilisation de produit [12].

## II. Analyse qualitative et quantitative :

L'analyse qualitative est réalisée généralement après extraction d'un ou des principes actifs dans le comprimé à l'aide des solvants appropriés. Les réactifs d'identification sont indiqués pour chaque type de principe actif. Pour arriver à réaliser cette analyse, on recourt souvent aux méthodes chimiques et aux techniques de chromatographie, on utilisant des substances de références internationales.

Toutefois, des dossiers techniques comportant des méthodes analytiques validés pour l'identification des principes actifs et pour la recherche des impuretés.

Pour l'analyse quantitative, les procédés de dosage sont indiqués pour chaque monographie en fonction de la nature des principes actifs. Diverses méthodes ont été mises au point pour arriver à réaliser cela, dont on peut citer certaines : la volumétrie, la spectrophotométrie UV/visible, les techniques chromatographique .... [13].

## III. Quelques Terminologies des médicaments :

### 1. Spécialité Pharmaceutique

Correspond selon le code de la santé publique à un médicament préparé à l'avance, dosé au poids médicinal présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale portant sa composition, le nom et l'adresse du fabricant [13].

### 2. 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 : européenne, Britannique, américaine, Japonaise, Chinoise et internationale.

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

Le laboratoire national de contrôle des médicaments, utilise la pharmacopée européenne et américaine pour l'analyse des médicaments [13].

### 3. La monographie :

La Pharmacopée Européenne est composée de monographies, aussi bien générales que spécifiques, dont nous détaillerons les différences ci-dessous. Toutes les molécules présentes sur le marché ne sont pourtant pas décrites dans la Pharmacopée Européenne. En effet, les molécules encore protégées par les brevets des industries pharmaceutiques ne sont pas disponibles. Ces molécules sont soumises aux monographies internes mises au point par les industries pharmaceutiques, et approuvées par les autorités compétentes lors du dépôt de CTD [14].

### 4. Les substances de référence :

La substance de référence est définie comme substance dans le titre et connue, il est utilisé 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 [13].



## IV. Impuretés dans Les produits pharmaceutiques

La plupart des substances pharmacologique actives sont des composés chimiques de synthèse, produits en grande quantité. La pureté d'un produit chimique synthétique est nécessaire à la qualité de la formulation galénique. Les impuretés doivent être présentes à des concentrations inférieures ou égale à une limite prédéfinie [13].

### 1. Définition :

Les impuretés sont des composées non désirées qui coexistent avec le produit pharmaceutique et apparaissent pendant la fabrication et /ou le stockage. Selon la définition donnée par la conférence internationale sur l'harmonisation (ICH) des impératifs techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain, une impureté est n'importe quel composant d'une substance à usage pharmaceutique qui n'est pas l'entité chimique définie comme substance. A l'exclusion des énantiomères et des formes polymorphes, ICH classe les impuretés liées à un produit pharmaceutique chimique en tant qu'inorganique, organique, ou solvants résiduels. Cependant, quelques substances pharmaceutiques sont des mélanges de composés de structures très proche ayant une activité similaire ; elles contribuent au résultat du dosage et ne pas sont considérées comme impuretés.

### 2. Impuretés organiques :

Les impuretés organiques, autres que les solvants, sont principalement composées des « substances apparentées », constituées par les précurseurs de synthèse, les produits secondaires, les intermédiaires de synthèse ainsi que les produits de dégradation. Il existe également une catégorie de molécules qui, selon les cas, peut être considérée soit comme faisant partie du produit de synthèse, soit comme une impureté : les isomères [14].

#### ✓ Substances apparentées

L'essai des « substances apparentées » est réalisé dans nombre de monographies afin de rechercher des éventuelles molécules organiques dérivées du produit synthétisé, ou potentiellement dangereuses. Il peut aussi bien s'agir de précurseurs de synthèse, que d'éléments intermédiaires, ou de produits de dégradation.

L'essai des substances apparentées a donc pour objectif de contrôler la présence d'impuretés indésirables toxiques ou non [14].

#### ✓ Isomères

La présence d'un (ou plusieurs) carbone(s) asymétrique(s), formant ainsi un (des) centre(s) de chiralité, peut engendrer des propriétés différentes pour chaque isomère. Ceci peut entraîner aussi bien des propriétés thérapeutiques différentes, que des toxicités différentes. Dans certains cas, ces isomères peuvent cependant être utilisés en mélange racémique.

C'est souvent le cas lorsque les propriétés sont extrêmement proches, ou lorsqu'aucun des isomères ne montre de toxicité excessive. Le coût de la séparation serait donc superflu. Cependant, pour certains isomères, l'un peut avoir un effet thérapeutique, tandis que l'autre est toxique [14].

### 3. Les impuretés inorganiques

Les impuretés inorganiques font référence aux éléments tels que les catalyseurs chimiques de réaction, source fréquente de métaux lourds, chlorures, sulfates, etc...

La présence potentielle de ces éléments est presque systématiquement vérifiés car ils sont très couramment utilisés au cours des synthèses et représentent un danger pour la santé publique [14].

#### 4. Solvants résiduels

Ils sont servis à la recristallisation du produit et se répartissent en plusieurs classes :

- Classe-1 dit toxique à éviter : benzène, dichlorométhane, trichlorométhane, trichlorure de carbone.
- Classe-2 toxique mais acceptables : acétonitrile, chloroforme, cyclohexane, toluène, pyridine, méthanol, dioxanne, diméthylformamide.
- Classe-3 autres : éthanol ou encore des solvants ayant peu de données toxicologiques (éther) Pour chaque classe, il existe une norme européenne sur les méthodes de recherche et sur les limites [14].

#### 5. Impuretés spécifiées et non spécifiées

Une impureté est dite « spécifiée » lorsqu'elle est individuellement citée et limitée par un critère d'acceptation spécifique dans une monographie et peut être identifiée ou non. A l'inverse, une impureté non spécifiée est limitée par un critère d'acceptation global et non individuellement citée avec un critère d'acceptation spécifique [15].

Les autres impuretés décelables sont des impuretés de structure définie dont on sait qu'elles sont détectées par les essais de la monographie mais ne sont normalement pas présentes au-delà du seuil d'identification. Elles font partie des impuretés non spécifiées et sont limitées par un critère d'acceptation global dans les monographies [15].

## V. Généralités sur l'insuline

### 1. Définition :

L'insuline est une hormone protéique sécrétée par les cellules  $\beta$  dans le pancréas, Elle a un effet important sur le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines en favorisant l'absorption du glucose présent dans le sang par les cellules adipeuses, les cellules du foie et celles des muscles squelettiques.[16]

Le glucose absorbé par ces tissus est converti en glycogène ou en triglycérides, voire en les deux à la fois dans le cas du foie. La libération de glucose par le foie dans le sang est très fortement limitée par un taux sanguin élevé en insuline. Cette hormone joue de ce fait, avec le glucagon, un rôle majeur dans la régulation des substrats énergétiques, dont les principaux sont le glucose, les acides gras et les corps cétoniques. [16]

Quand une personne est atteinte de diabète, le pancréas ne sécrète pas suffisamment d'insuline pour répondre aux besoins de son corps, ou le corps ne peut pas utiliser convenablement l'insuline produite. Comme le glucose ne peut pas être utilisé ou entreposé convenablement, il s'accumule dans la circulation sanguine. **L'insuline injectée sous la peau contribue à abaisser le taux de glucose sanguin.**[16]

### 2. L'insuline humaine :

La forme circulante (et biologiquement active) de l'insuline humaine est un monomère constitué de deux chaînes, une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés, liées par deux ponts disulfure. Cette forme monomère n'existe qu'à faible concentration. À plus forte concentration, en solution aqueuse, à un pH compris entre 2 et 8, elle a tendance à s'agréger en dimères stables et, en présence de zinc, en hexamères. Ces hexamères ont une structure presque sphérique avec un diamètre de 5 nm et une hauteur de 3,5 nm. [17]

La chaîne A représente la majorité de la surface polaire de cet hexamère. L'insuline humaine après injection sous-cutanée est présente dans le dépôt à forte concentration, donc sous forme d'hexamères. Les hexamères ne traversent pas la paroi des capillaires, la résorption de l'insuline à partir du dépôt se fait après libération de dimères et monomères[17].



Figure 5: la structure de l'insuline humaine

Les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des insulines standards (préparations à base d'insuline humaine recombinante de durée d'action brève, intermédiaire ou prolongée) rendent quasiment impossible toute tentative d'obtention d'une normoglycémie soutenue.

L'insulinothérapie à base d'insuline humaine recombinante ne permet pas de mimer de façon précise les différentes phases de sécrétion (basale et prandiale) décrites ci-dessus mais y répond globalement ; des molécules imitant précisément chaque composante sont nécessaires pour éviter l'apparition d'hypoglycémies. Or, avant l'apparition des analogues de l'insuline, les améliorations des formulations d'insuline étaient techniquement limitées.

Les principales modifications chimiques apportées à l'insuline de séquence humaine pour en faire des analogues sont des mutations dans sa séquence par la technique de l'ADN recombinant et des hémi-synthèses chimiques, par exemple la greffe de groupements chimiques sur les acides aminés [18].

## **VI. Insuline Glargine :**

### **1. Définition :**

L'Insuline Glargine est un analogue de l'insuline humaine à action prolongée, elle commence à agir 90 minutes après l'injection, et son effet peut durer pendant environ 24 heures, elle assure une maîtrise prolongée de la glycémie entre les repas et durant la nuit, elle sera commercialisée sous forme de stylo (auto-injecteur) pré-rempli et de cartouches pour les stylos rechargeables.

L'insuline basale est un important soutien du traitement des diabètes de type 1 et 2 et apporte aux professionnels de santé une autre option pour répondre aux besoins du traitement insulinique. Après l'injection, l'Insuline Glargine est libérée lentement et constamment dans la circulation sanguine.

Ce médicament est disponible sous diverses marques ou sous différentes présentations ou les deux. Une marque spécifique de ce médicament n'est peut-être pas offerte sous toutes les formes, ni avoir été prouvée contre toutes les affections dont il est question ici. En outre, certaines formes de ce médicament pourraient ne pas être utilisées contre toutes les infections mentionnées dans cet article [19].

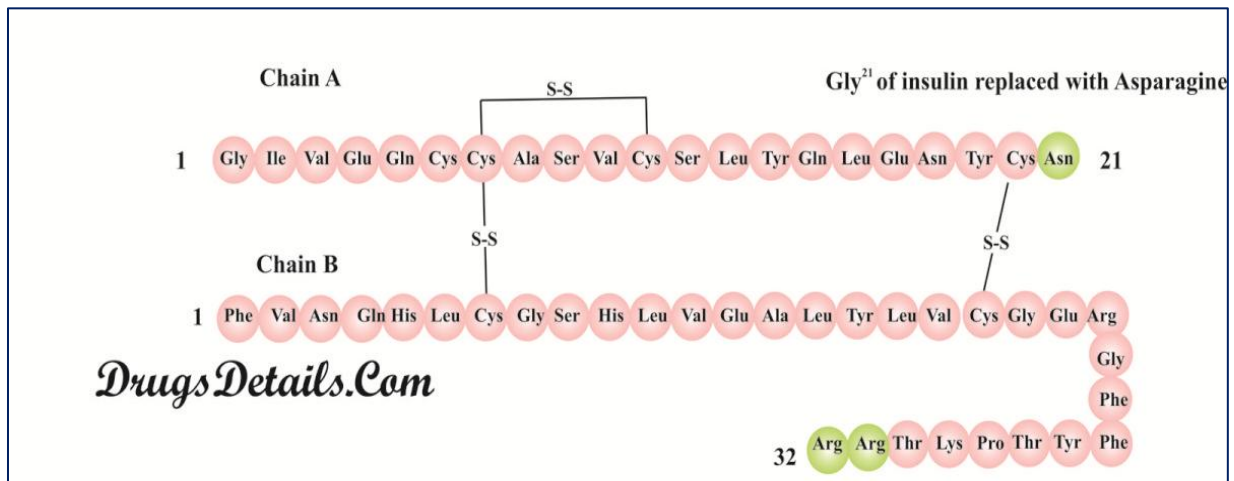
### **2. Structure d'Insuline Glargine**

L'insuline ArgB31, ArgB32 fut une des premières molécules testées avec un pI proche de la neutralité dans le but de prolonger la durée d'action. Cependant, la biodisponibilité n'était pas optimale et la formation du dépôt d'insuline dans le tissu sous-cutané n'était pas plus importante qu'avec l'insuline Neutral Protamine Hagedorn (NPH).

Une substitution supplémentaire en A21 a permis de développer une insuline avec une structure hexamérique plus stable : l'Insuline Glargine, qui est un analogue de l'insuline d'action prolongée résultant de l'élongation de la partie C-terminale de la chaîne B de l'insuline par deux acides aminés arginine et de la substitution de l'asparagine en A21 par la glycine.

L'addition de deux résidus arginine modifie le pI de la molécule : 6,7 pour l'Insuline Glargine. Ce déplacement du pI, insolubilise la molécule à pH neutre ou physiologique et

conduit à la formation de micro-précipités au point d'injection .Ainsi, son absorption dans la circulation sanguine est retardée. L'addition de petites quantités de zinc (30 mg/mL) retarde davantage l'absorption (figure 6) [20].



**Figure6: structure d'Insuline Glargine**

### 3. Mécanisme d'action

L'Insuline Glargine est peu soluble à pH neutre, totalement soluble au pH acide. Après injection dans le tissu sous-cutané, la solution acide est neutralisée, ce qui induit la formation de micro-précipités à partir desquels de petites quantités d'Insuline Glargine sont libérées de façon continue. De ce fait, la courbe concentration/temps est régulière, sans pics, prévisible, et la durée d'action est prolongée [21].

Le principal effet de l'insuline, y compris l'Insuline Glargine, est de réguler le métabolisme du glucose, en diminuant la glycémie et stimulant la captation périphérique du glucose, en particulier dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux, et en inhibant la production hépatique de glucose. [21].

Des études de pharmacologie clinique ont montré que des doses identiques d'Insuline Glargine et d'insuline humaine, administrées par voie intraveineuse, étaient équipotentes. Comme pour toutes les insulines, l'activité physique et d'autres paramètres peuvent affecter le profil d'action en fonction du temps de l'Insuline Glargine [22].

### 4. Contrôles Communs à toutes les insulines

- Détermination du pH
- Détermination des endotoxines bactériennes
- Recherche des impuretés de masse moléculaire >à celle de l'insuline(HMWP)
- Recherche des protéines apparentées
- Dosage du zinc total et de l'insuline totale

#### Spécifiques aux insulines retard :

- Dosage du zinc en solution dans les préparations d'insuline NPH et insulines zinc
- Dosage de l'insuline dissoute dans le surnageant[23] .



## 5. Stabilité et conditions de conservation des préparations d'insulines

### 1.5 Stabilité physique

Toutes les préparations d'insuline humaine et d'analogues doivent être conservées à l'abri de la lumière et à une température comprise entre +2 et +8°C en évitant la congélation. La durée maximale d'utilisation est de :

- 18 mois pour les insulines renfermant de la protamine
- 2 ans pour les autres insulines.

### 2.5 Stabilité chimique

- Les insulines rapides peuvent se dégrader en libérant des ions ammonium et des dérivés désamidés.
- Toutes les préparations d'insuline humaine peuvent subir une dimérisation.
- La formation de dimères augmente très rapidement avec la température.

### 3.5 Stabilité biologique

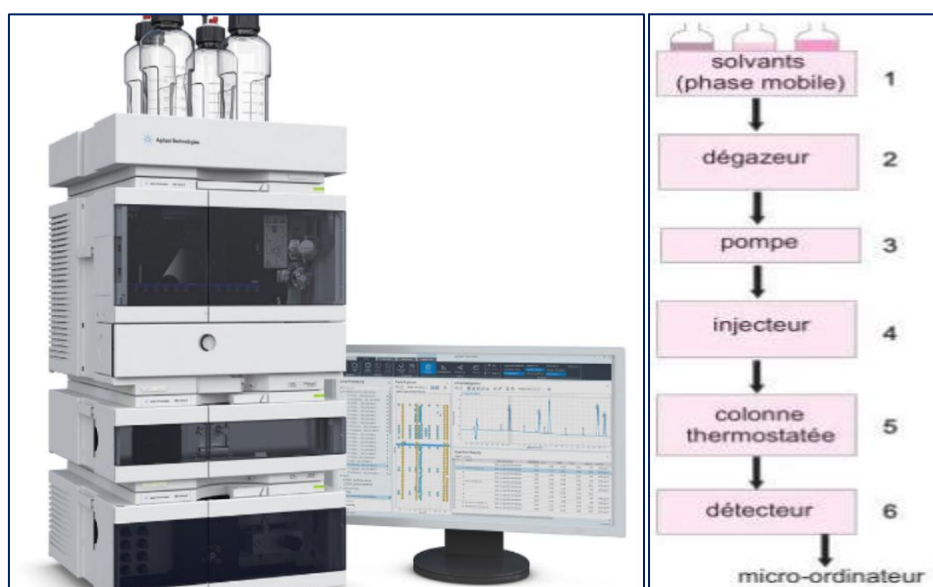
L'activité biologique de l'insuline baisse selon une cinétique d'ordre 1 avec la prolongation de la durée de conservation et l'élévation de la température de conservation. La dégradation de l'activité biologique à une même température et pendant un laps de temps identique est 100 fois plus important au soleil qu'à l'abri de la lumière [23].

## I. Introduction :

La chromatographie liquide à haut performance est une technique d'analyse qui permet la séparation d'un ou plusieurs composés d'un mélange pour leur identification et leur quantification, c'est la méthode de choix pour doser Insuline Glargine et ses impuretés dans les deux spécialités pharmaceutiques.

L'HPLC a la possibilité de séparer et d'identifier les composés qui sont présents dans tout échantillon qui peuvent être dissous dans un liquide en concentrations infimes de l'ordre de parties par milliard. Cette versatilité permet d'utiliser l'HPLC dans une variété d'applications industrielles et scientifiques comme les produits pharmaceutiques, l'environnement, la médecine légale et les produits chimiques.

Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation de phases stationnaires très élaborées.



**Figure 7: Appareil de chromatographie liquide à haut performance**

### 1. Principe

Le principe de séparation repose sur l'interaction des solutés entre deux phases non miscibles : la phase stationnaire qui est fixe et la phase mobile [24].

L'échantillon à analyser, mis en solution dans un solvant approprié est placé au sommet d'une colonne garnie d'un support (phase stationnaire) choisi en fonction de la nature de soluté à analyser. Ce soluté migre dans la colonne sous l'action d'un solvant qui constitue la phase mobile, ainsi les différents constituants migrent dans la colonne et se séparent en fonction de leurs : polarité, poids moléculaire et le caractère ionique.

Les composants de l'échantillon séparés sont acheminés jusqu'au détecteur, relié à un enregistreur et éventuellement à un intégrateur. Ceci permet la séparation et la purification d'un ou plusieurs composés d'un mélange en permettant leur identification et leur quantification [25].

## 2. Différents types de chromatographie liquide

La chromatographie liquide à haute performance HPLC est basée sur le partage de l'analyte entre une phase liquide mobile et une phase stationnaire solide très finement divisée, pour obtenir un débit satisfaisant, il faut appliquer de très fortes pressions. Suivant la nature des analytes à séparer divers types d'interactions entre soluté et phase stationnaire peuvent être utilisées:

**Chromatographie d'adsorption :** Dans cette chromatographie, la phase stationnaire consiste en une matière solide à grand pouvoir d'adsorption, tel que l'oxyde d'aluminium, les silicates de magnésium, les gels de silice. Les composants sont simplement plus ou moins retenus à la surface de la phase stationnaire par adsorption physique. C'est une technique qui prend en compte la polarité des composants [26].

**Chromatographie de partage :** Dans cette chromatographie, les analytes sont séparés en fonction de leur affinité avec les phases stationnaire et mobile. L'affinité dépend de la polarité des analytes et des phases. En mode normal, la phase stationnaire est polaire et en mode inverse, elle est apolaire [26].

**Chromatographie d'échange d'ions :** La phase solide est une résine insoluble munie de groupes fonctionnels capable de dissocier. Ce sont, habituellement, des groupes « acide sulfonique » ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) pour les échangeurs de cations et « ammonium quaternaire » ( $\text{N}(\text{R})_3$ ) pour les échangeurs d'anions [26].

**Chromatographie d'exclusion stérique :** Les composants sont séparés selon leur dimension moléculaire. La phase stationnaire est composée d'un matériau poreux (petites particules de silice ou de polymères), les molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores ne peuvent pénétrer et ne sont pas retenues. La durée de séjour dans la colonne augmente lorsque la taille des analytes diminue [26].

## II. L'appareillage :

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, 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 (avec un logiciel pour traiter les signaux).

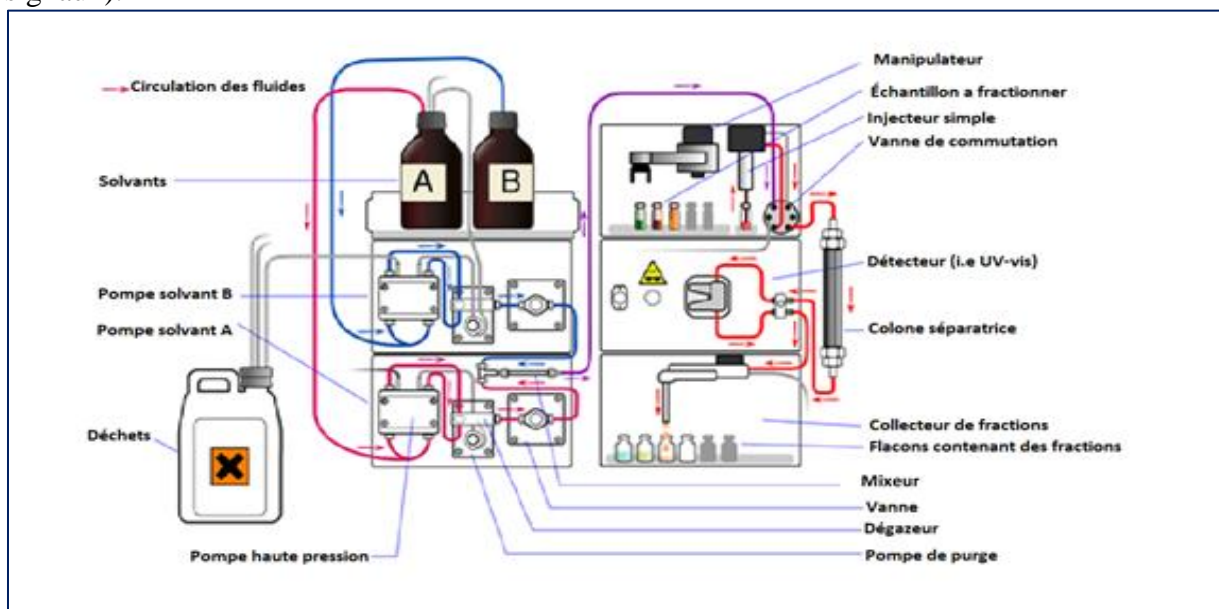


Figure 8: les constituants de chromatographie liquide à haut performance

### 1. Un ou plusieurs réservoirs de solvant

Contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse[27].

### 2. La pompe

Le rôle de la pompe en HPLC est de pousser l'éluant à travers la colonne à une pression élevée et à un débit constant, elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une Programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- **en mode isocratique**, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- **en mode gradient**, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques  $\mu\text{l}$  à plusieurs  $\text{ml}/\text{min}$  [28].

### 3. Vanne d'injection

**Injecteur manuel** : Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10,20,50 $\mu\text{l}$ ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillonnage sans modifier la pression dans la colonne (figure9) [29].

**Injecteur automatique** : Il permet de fixer automatiquement le volume d'injection voulu à l'aide d'un ordinateur et l'injection se fait automatiquement [29].

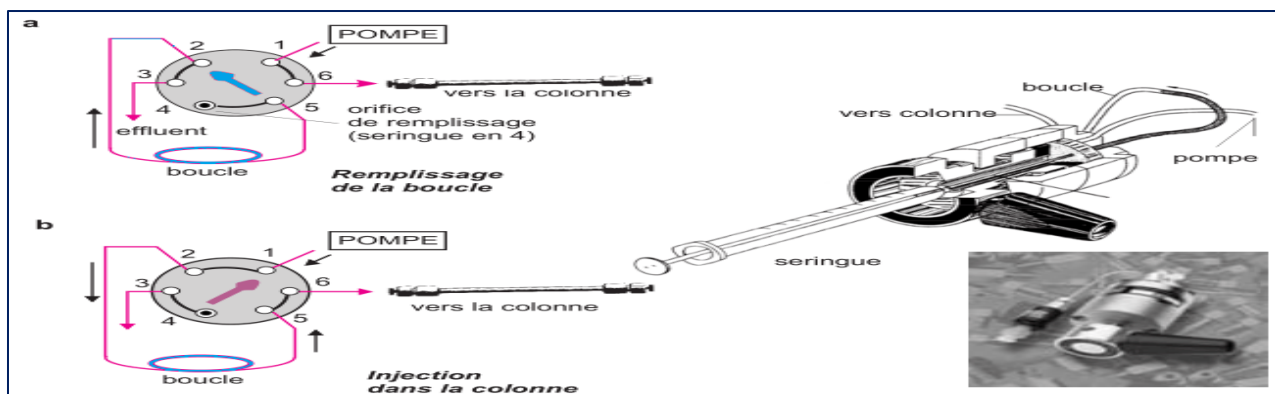


Figure 9: injection avec boucle a) remplissage de la boucle, b) injection dans la colonne.

#### 4. La colonne

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10  $\mu\text{m}$ .

La colonne est souvent précédée d'une pré-colonne, dite colonne de garde (0,4-1cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés (figure 10). On augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ces performances [30].

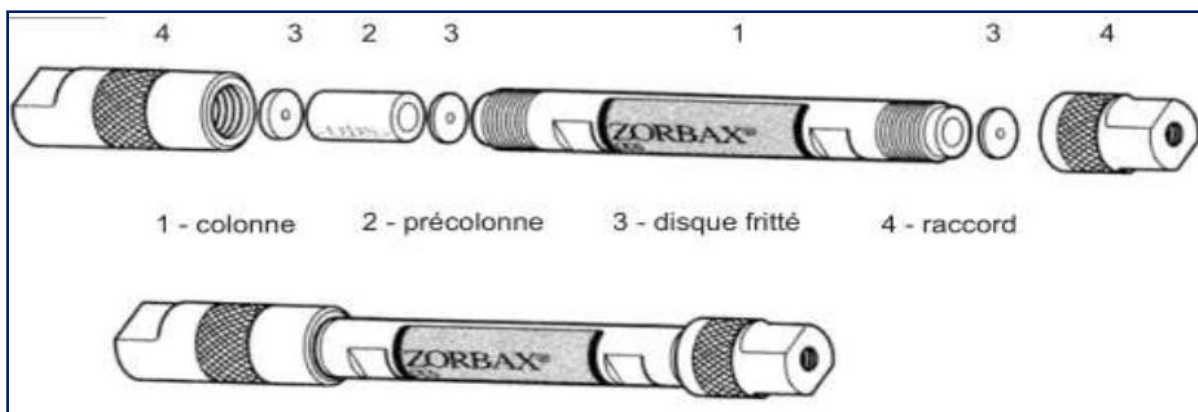


Figure 10: colonne standard et pré-colonne d'HPLC

#### 5. La phase stationnaire

##### La phase normale :

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

##### La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (MeCN, MeOH, H<sub>2</sub>O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en

premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

## 6. La phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale où à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés.

## 7. Le dégazeur

Comme son nom l'indique, ce composant permet de retirer le gaz (oxygène) présent dans le(s) solvant(s) afin d'éviter d'endommager les échantillons ou la phase stationnaire. Deux types de dégazeurs sont utilisés en HPLC :

**Dégazeur à gaz inerte** : On fait barboter un gaz inerte dans la PM (Phase Mobile) pour retirer le gaz dissous dans le liquide. L'hélium est le gaz inerte le plus utilisé pour cette application.

**Dégazeur par vide**: Cette méthode consiste à descendre en pression dans une enceinte où se trouve le solvant à l'aide d'une pompe à vide primaire, et ainsi séparer le gaz dissous dans le fluide. Elle est bien plus efficace, ne requiert plus de gaz inerte, et remplace de plus en plus l'ancienne technique dans le domaine de l'analyse HPLC. La pression dans l'enceinte est de l'ordre du millibar [32].

## 8. Le Détecteur

Il détecte le passage des composés dans une cellule de mesure et délivre un signal électrique proportionnel à leur concentration.

En HPLC, plusieurs modes de détection sont utilisés selon la nature et les propriétés des solutés (le détecteur à absorption dans l'UV et le visible, le détecteur à fluorescence, le détecteur à conductivité thermique, le détecteur électrochimique...).

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés :

- **UV visible** (celui que nous utilisons) : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne
- **Réfractomètre** : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide

Quelque soit le détecteur utilisé il doit répondre à certaines exigences :

- bruit de fond réduit. Celui-ci est mesuré en l'absence de la phase mobile.
- stabilité de la ligne de base.
- sensibilité importante.
- linéarité : le signal électrique du détecteur doit être linéaire avec la concentration [32].

## 9. Enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport signal / bruit doit être au moins de trois. Le bruit se traduit par des oscillations plus ou moins marquées autour de la ligne de base, ce bruit de fond aléatoire provient de diverses causes :

- La variation de température.
- La pression.
- L'instabilité électronique.

Par ailleurs on doit avoir une ligne de base aussi proche que possible de l'horizontale[32].

### III. Les grandeurs caractérisant la qualité de séparation et la performance de la colonne

#### 1. L'efficacité de la colonne

L'efficacité d'une colonne analytique d'une chaîne HPLC peut s'exprimer par le nombre **N** de plateaux théoriques.

Plus le nombre des plateaux théoriques **N** sont élevés, plus la colonne est efficace.

On définit également HEPT, la hauteur équivalente à un plateau théorique, et **L**, la longueur de la colonne. Plus la hauteur du plateau HEPT est faible, plus la colonne est efficace.

L'efficacité est mesurée par le nombre des plateaux théoriques **N** :

La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT, qui est défini comme :

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N_{th}}$$

**L** : Longueur de la colonne

**N<sub>th</sub>** : Nombre de plateaux théoriques

$t_r$  : temps de rétention

$\omega_{1/2}$  : largeur du pic à mi-hauteur

$$N_{th} = 5,54 \left( \frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

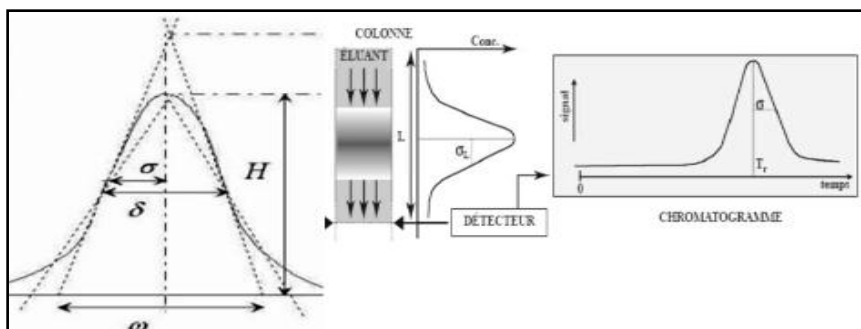


Figure 11: Les grandeurs de calculs de nombre des plateaux théoriques

**Remarque :**  $N_{th}$  est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser  $N_{eff}$  (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{eff} = 5,54 \left( \frac{t_r - t_m}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

**NB :** Expérimentalement  $t_m$  est difficile à déterminer d'où l'utilisation de  $N_{th}$ .

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire [24].

## 2. La résolution (R) :

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs (figure 12). Elle est exprimée à partir des temps de rétention. La résolution est calculée à partir de la relation suivante :

$$R_s = 2 (t_{r2} - t_{r1}) / (\omega_{1/2}(1) + \omega_{1/2}(2))$$

- $R < 1$  : mauvaise résolution
- $1 < R < 1,4$  : résolution acceptable
- $1,4 < R < 1,6$  : résolution optimale
- $R > 1,6$  : résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé [24].

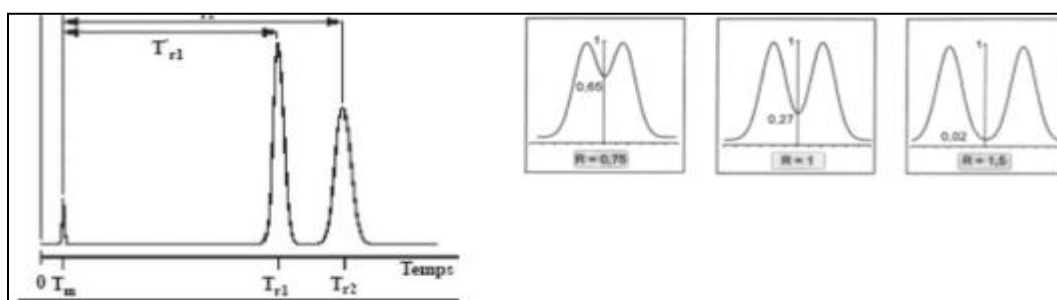


Figure 12: calcul du facteur de résolution

## 3. La sélectivité:

La sélectivité et le pouvoir de distinguer en deux composés, il est toujours supérieur à 1. C'est une condition nécessaire et suffisante pour décrire une séparation.

$$\alpha = \frac{t_{rb} - t_m}{t_{ra} - t_m}$$

$t_m$  : le temps morte

$t_{ra}$  : le temps de rétention de composé a

$t_{rb}$  : le temps de rétention de composé b

**Avant l'utilisation de l'appareil HPLC pour une analyse donnée, il faut d'abord vérifier un certain nombre de paramètres tel que : P/V et  $F_s$**

## IV. Conformité du système : système suitability (SST)

C'est le test de conformité du système, il est couramment utilisé dans les laboratoires pour assurer que le système analytique est valide (y compris l'instrument, les réactifs, les colonnes et les analyseurs) adapté à l'application prévue.

La pharmacopée américaine a définie la « suitability » comme "Les tests d'aptitude" font partie intégrante des méthodes de chromatographie liquide et gazeuse. Ils sont utilisés pour vérifier si la résolution et la reproductibilité du système chromatographique sont adéquates pour l'analyse à effectuer.

L'objectif général des tests d'adéquation du système est de surveiller les résultats chromatographiques (à savoir le facteur de symétrie, l'efficacité de la colonne et la résolution des paires de pics critiques) et les cohérentes performances du système.

Les calculs SST sont généralement effectués sur des standards avant que tous les échantillons soient analysés [33].



### 1. Rapport pic-valé (p / v):

Le rapport p/v peut être utilisé comme critère d'aptitude du système dans un essai pour des substances apparentées lorsque la séparation de base entre deux pics n'est pas atteinte.

La figure suivante représente une séparation partielle de deux substances, où  $H_p$  est la hauteur au-dessus de la ligne de base extrapolée du pic mineur et  $H_v$  est la hauteur au-dessus de la ligne de base extrapolée au plus bas point de la courbe séparant les pics mineurs et majeurs:

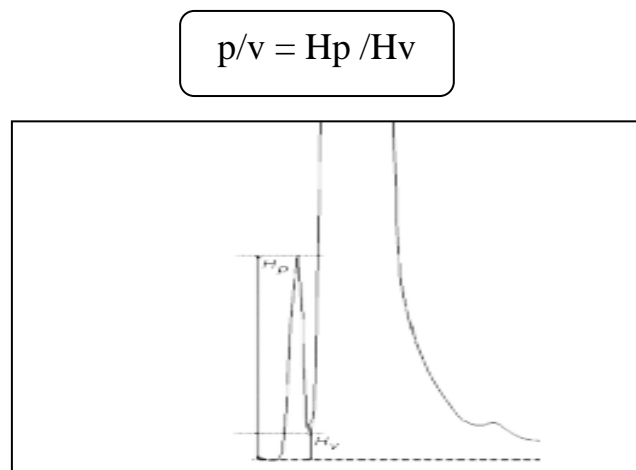


Figure 13: Détermination du rapport pic-vallée.

### 2. Facteur d'asymétrie $F_s$ :

Aussi connu sous le nom de "tailing factor", d'un pic (voir la figure) est calculé par:

$$F_s = W_{0.05} / 2f$$

D'où  $W_{0.05}$  est la largeur du pic à 5% de hauteur et  $f$  est la distance entre le maximum du pic et le bord d'attaque du pic, la distance étant mesurée à un point situé à 5% de la hauteur du pic par rapport à la ligne de base [34].

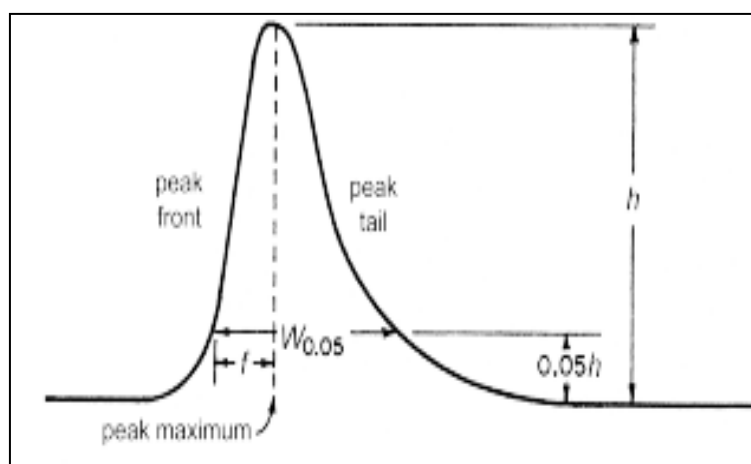


Figure 14: pic chromatographique

Ces tests d'adéquation du système sont effectués en collectant des données à partir d'injections répétées des solutions standards ou d'autres solutions spécifiées dans la monographie individuelle. La spécification des paramètres définitifs dans une monographie n'exclut pas l'utilisation d'autres conditions de fonctionnement appropriées, des ajustements au système chromatographique spécifié peuvent être nécessaires afin de répondre aux exigences d'adéquation du système chromatographique [33].

## I. Introduction :

Les médicaments sont des produits dont la qualité est garantie par le contrôle continu depuis la matière première jusqu'au produit fini, le dosage et l'identification de toute molécule médicamenteuse font appel à des procédés analytiques très divers.

Alors dans ce travail au sein de LNCM, nous allons faire le dosage du principe actif (l'Insuline Glargine) et des impuretés dans deux spécialités pharmaceutique par la méthode de chromatographie liquide à haute performance.

Le contrôle consiste à comparer les chromatogrammes du standard, principe actif (Insuline Glargine), les impuretés de haut poids moléculaire et les substances apparentés à celui de l'échantillon à analyser, ainsi que le calcul des teneurs en principe actif, et impureté.

### Partie 1 : Dosage de la première spécialité pharmaceutique

#### I. Matériel et méthode :

##### 1. Réactifs et solvant :

- Acide chlorhydrique (HCl)
- Anhydride sodium dodecyle ( $\text{Na}_2\text{SO}_4, 10 \text{ H}_2\text{O}$ )
- Acide Ortho-phosphorique
- L-arginine
- Acide acétique
- Acétonitrile
- Le standard de travail (pour la vérification de résolution)

##### 2. Appareillage :

- Chromatographie liquide à haute performance
- Balance : Mettler Tolido
- Bain à ultra son : sonicasoltec
- pH Mètre
- HMWP résolution standard

#### II. Dosage des impuretés de haut poids moléculaire(HMWP) :

##### 1. Préparation des solutions :

###### ➤ Préparation de la phase mobile :

On met 150ml d'acide acétique dans un bécher et on lui ajoute 200ml d'acétonitrile et 650 ml de L-arginine 1g /l.

###### ➤ Préparation d'HCl 0.01M (diluent) :

On dissout 8,5ml d'acide chlorhydrique dans 1000ml d'eau bidistillée pour avoir une concentration de 0,1M HCl. On prélève ensuite 10ml de la solution préparée et on lui ajoute 100 ml d'eau bidistillée.

➤ **Solution de résolution :**

On dissout 40mg du standard de l'Insuline Glargine dans 10ml d'HCl 0.01M.

➤ **Solution d'essai :**

On mélange 30 unités de médicament de 3ml et on prélève 1ml de la solution après homogénéisation.

**2. Condition chromatographique :**

Le tableau suivant montre les conditions chromatographiques utilisées pour le dosage des impuretés de hauts poids moléculaires, on a travaillé en mode iso-cratique (une seule phase durant toute l'analyse), on a utilisé le détecteur UV-visible.

**Tableau 1: les conditions chromatographiques utilisés pour le dosage de HMWP**

Colonne	Colonne (7.8*300) ,7.8mm de diamètre interne
Longueur d'onde	276 nm
Débit	0.50mL/min
Volume injecté	100µL
Le temps d'analyse	45min
Température de la colonne	25°C
Température de l'échantillon	2°C-8°C

**3. Conformité du système :**

La qualité des résultats d'analyse repose essentiellement sur la validité des méthodes d'analyse et la fiabilité de l'appareillage. Ainsi avant l'analyse, il faudra s'assurer que les performances du système sont maintenues lors de l'application de la méthode en routine en utilisant des tests de conformité du système, qui doivent répondre aux exigences fixées.

- Pour vérifier la conformité du système utilisé, On injecte 100µL de solution de résolution.
- **Critère d'acceptation :** Le test n'est validé que si la le pic /valle est supérieur à 2.

#### 4. Résultat et discussions :

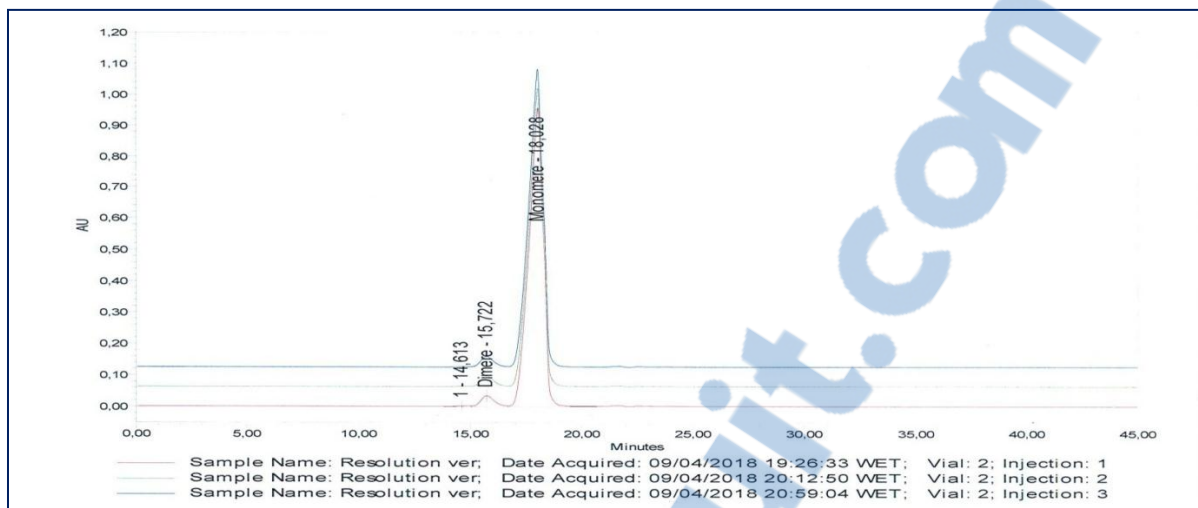


Figure 15: chromatogramme de vérification de la conformité du système

Tableau 2: résultats du rapport pic/vallée

Peak Summary with Statistics												
Name: Dimere												
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Symmetry Factor	EP Plate Count	Int Type	End p/v
1	Resolution ver	2	2	Dimere	15,722	1405049	3,15	33819	1,263307e+000	3,468866e+003	VV	24,614188
2	Resolution ver	2	3	Dimere	15,710	1393487	3,13	33696	1,273797e+000	3,480739e+003	VV	25,321208
3	Resolution ver	2	1	Dimere	15,722	1392587	3,13	33707	1,263058e+000	3,478095e+003	VV	25,049401
Mean					15,718							
Std. Dev.					0,007							
% RSD					0,04							

Le pic vallée des trois injections est en moyenne de  $24,99 \geq 2$  (tableau 2). Donc le système est valide.

On injecte trois essais après avoir vérifié la conformité du système, les résultats obtenus se résument dans les chromatogrammes suivants :

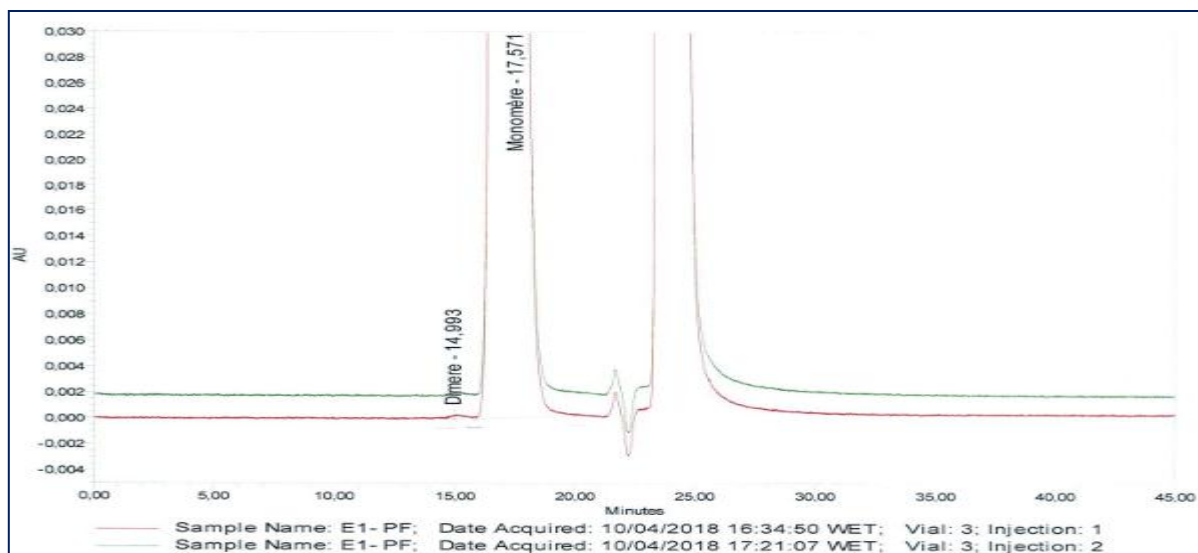


Figure 16: Chromatogramme de solution d'essai 1 à 276 nm

Tableau 3: résultats de la solution d'essai 1

Peak Summary with Statistics										
Name: Dimere										
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Int Type	EP Plate Count
1	E1- PF	3	2	Dimere	15,142	10060	0,02	279	bb	5,152790e+003
2	E1- PF	3	1	Dimere	14,993	10286	0,02	302	bb	8,797589e+003
Mean					15,068	10173,0	0,0			
Std. Dev.					0,106	159,9	0,0			
% RSD					0,70	1,6	1,6			

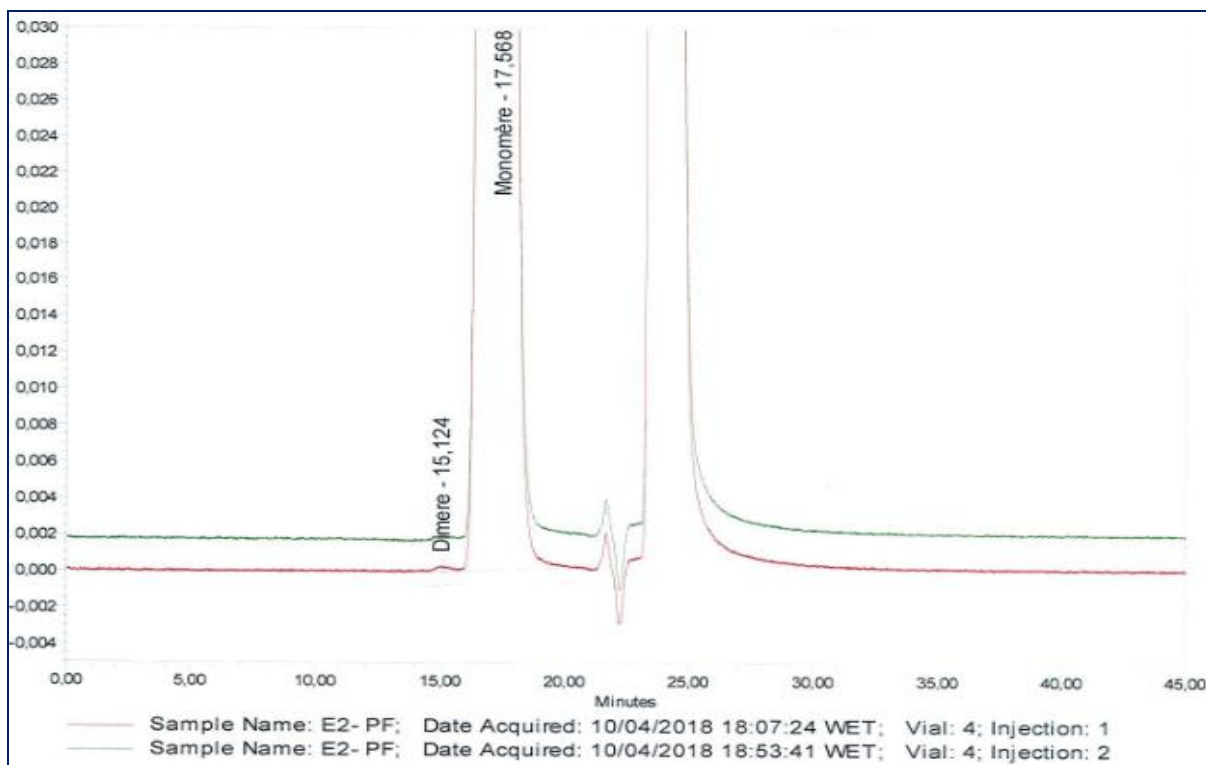
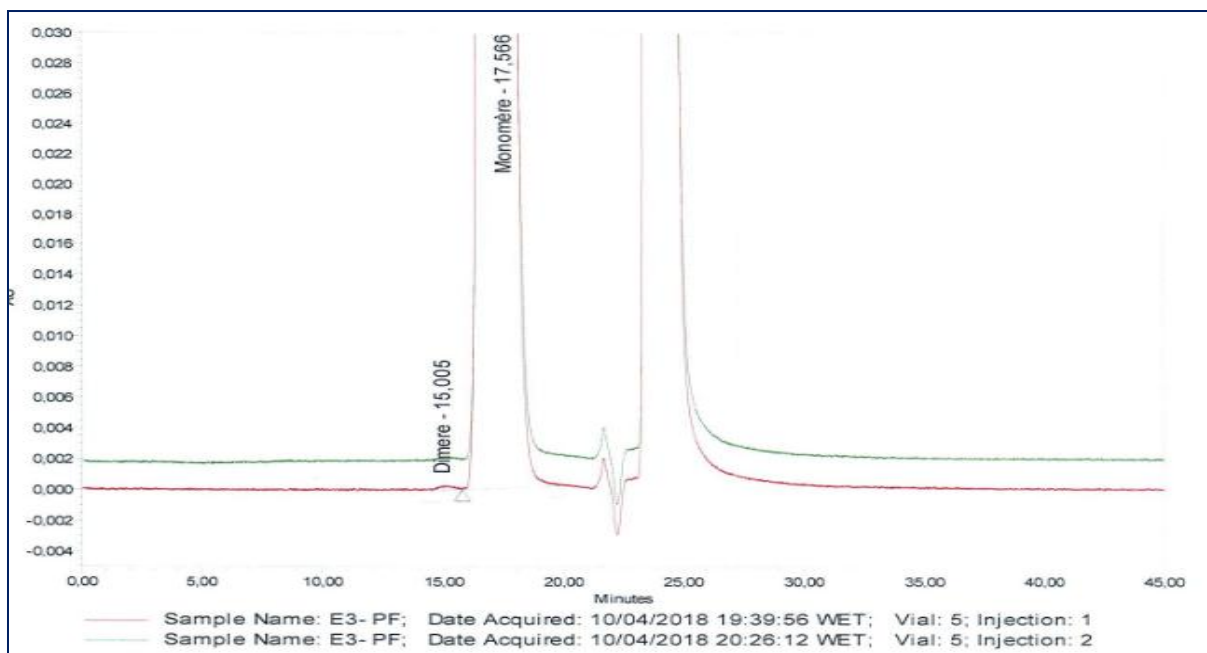


Figure 17: Chromatogramme de solution d'essai 2 à 276 nm

Tableau 4: résultats de la solution d'essai 2

Peak Summary with Statistics										
Name: Dimere										
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Int Type	EP Plate Count
1	E2- PF	4	2	Dimere	15,134	9427	0,02	304	bb	4,735754e+003
2	E2- PF	4	1	Dimere	15,124	10823	0,02	362	bb	7,400878e+003
Mean					15,129	10125,0	0,0			
Std. Dev.					0,008	987,3	0,0			
% RSD					0,05	9,8	9,7			





**Figure 18: chromatogramme de la solution d'essai 3 à 276nm**

**Tableau 5: résultats de la solution d'essai 3**

Peak Summary with Statistics										
Name: Dimere										
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Int Type	EP Plate Count
1	E3- PF	5	2	Dimere	15,109	12245	0,03	322	bb	2,932974e+003
2	E3- PF	5	1	Dimere	15,005	11691	0,03	363	bb	1,280493e+004
Mean					15,057	11968,0	0,0			
Std. Dev.					0,073	392,2	0,0			
% RSD					0,49	3,3	3,3			

**Critères d'acceptation :**

Le pourcentage des impuretés est supérieur à la limite de détection et inférieur à la limite de quantification.

- Le pourcentage des impuretés trouvé pour les trois solutions d'essai et entre 0,02%-0,03% (tableaux 3,4,5).
- Les résultats sont conformes aux spécifications.

**Tableau 6: les normes de la limite de détection et de la limite de quantification**

Impureté	Limite de quantification	Limite de détection
Toute impureté individuelle	0,05%	0,015%



### III. Dosage du principe actif dans le produit fini :

Pour le dosage du principe actif, on a utilisée les conditions chromatographiques suivants :

On a travaillé en mode gradient (c.-à-d. deux phase A et B avec des proportions différents tout au long de l'analyse), 214 nm et la longueur d'onde utilisée pour une absorption maximale d'Insuline Glargine.

**Tableau 7: les conditions chromatographiques de dosage du PA (l'Insuline Glargine)**

Colonne	ACE C18, (250×4.6) mm
Longueur d'onde	214nm
Débit	1mL/min
Volume injecté	10µL
Le temps d'analyse	50min
Température de la colonne	40°C
Température de l'échantillon	2°C-8°C

#### 1. Préparation de la phase mobile :

##### ➤ Préparation du tampon sulfate de sodium :

On dissout 193,04g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (sodium sulfate dodecyl) dans 3000ml d'eau. On ajuste le pH à  $3 \pm 0.05$  avec une solution d'ortho-phosphorique d'acide.

##### ➤ Préparation de la phase mobile A :

On ajoute 1800 ml de la solution tampon de sulfate de sodium à 200ml d'acétonitrile.

##### ➤ Préparation de la phase B :

On ajoute 1100ml de la solution tampon de sulfate de sodium à 900ml d'acétonitrile

**Tableau 8: programme d'élution**

Temps	Phase mobile A (%v /v)	Phase mobile B (%v /v)
0	65	35
5	60	40
25	50	50
30	50	50
45	65	35
50	65	35

## 2. Préparation des solutions :

### ➤ Solution standard :

On dissout 15mg du standard d'Insuline Glargine dans 10ml de HCl (0,01M). La solution préparée est stable pendant les 120 heures.

### ➤ Solution d'essai :

On mélange 15 unités des médicaments dans une fiole de 100 ml. On prélève 2ml de la solution homogénéisée dans une fiole de 5mL et on complète avec une solution de HCl 0,01M. Trois échantillons sont préparés. Les solutions sont stables pendant 48 heures.

## 3. Conformité du système :

### 3.1 Critère d'acceptation :

- le coefficient de variation (RSD) des six injections de la solution standard :  $RSD \leq 2\%$
- Facteur de symétrie :  $F_{sym} \leq 2$ .
- Nombre des plateaux théoriques :  $N_{th} \geq 5000$

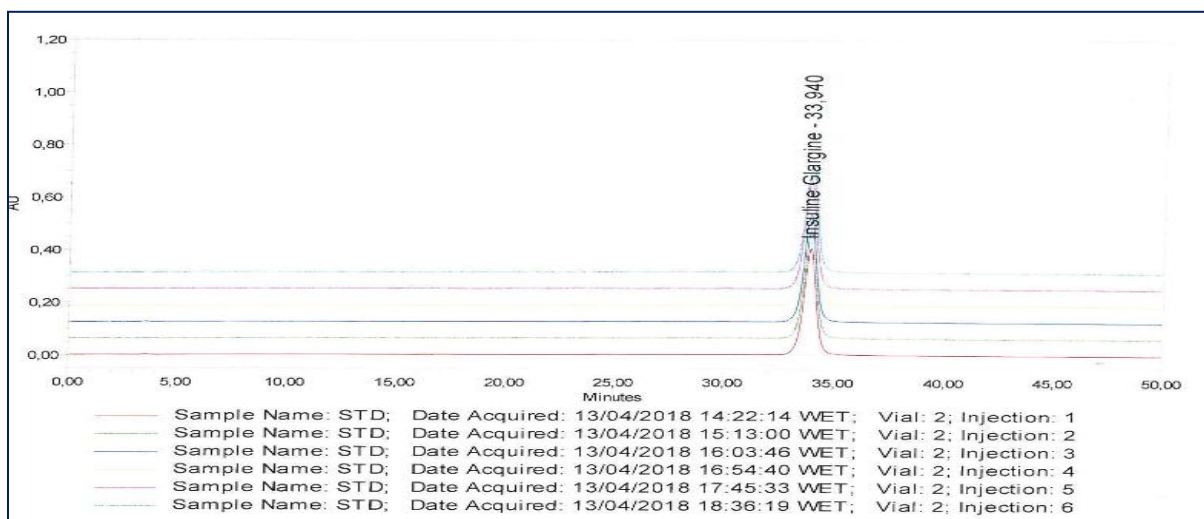


Figure19: chromatogramme de six injections de la solution standard

Tableau 9: résultats de six injections de solution standard d'Insuline Glargine

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Int Type	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	STD	2	1	Insuline Glargine	33,940	15838922	100,00	402919	BB	1,949091e+004	9,306241e-001
2	STD	2	2	Insuline Glargine	33,945	15871334	100,00	405108	BB	1,962245e+004	9,343458e-001
3	STD	2	6	Insuline Glargine	33,945	15917831	100,00	409017	BB	1,988718e+004	9,395449e-001
4	STD	2	4	Insuline Glargine	33,941	15891969	100,00	404980	BB	1,950960e+004	9,396578e-001
5	STD	2	5	Insuline Glargine	33,916	15929064	100,00	408683	BB	1,966269e+004	9,414363e-001
6	STD	2	3	Insuline Glargine	33,926	15907778	100,00	406508	BB	1,954132e+004	9,373564e-001
Mean					33,935	15892816,5	100,0				
Std. Dev.					0,012	33257,5	0,0				
% RSD					0,03	0,2	0,0				

### 3.2 Résultat et discussion :

Le coefficient de variation RSD :

- 0.2% pour la précision de l'air de pic.
- 0.03% pour la précision du temps de rétention du pic de standard.

Le facteur de symétrie : 0.9 (tableau 9)

Nombre des plateaux théoriques : 19490 (tableau 9) et (figure 19)

- Donc la conformité du système et valide

Après la vérification de conformité du système, on injecte les trois solutions d'essais, les résultats trouvés sont les suivants :

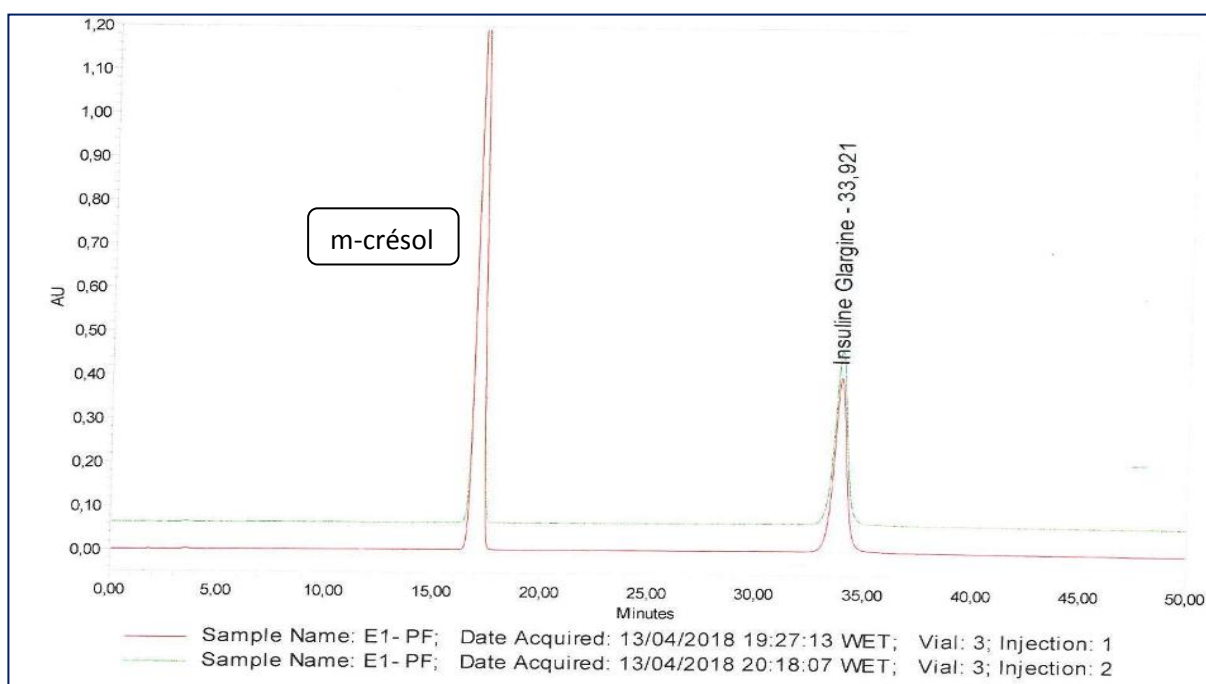
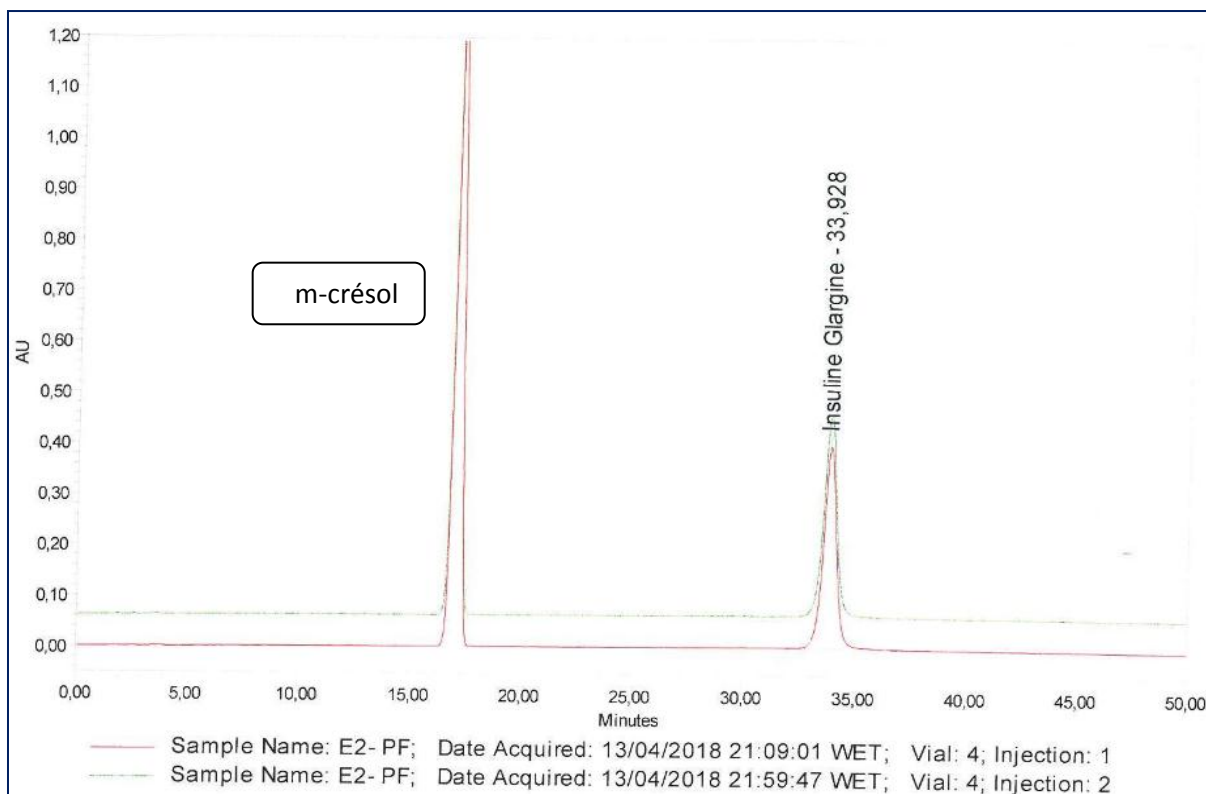


Figure 20: chromatogramme de solution d'essai 1 à 214 nm.

Tableau 10: résultats d'injection de solution d'essai 1

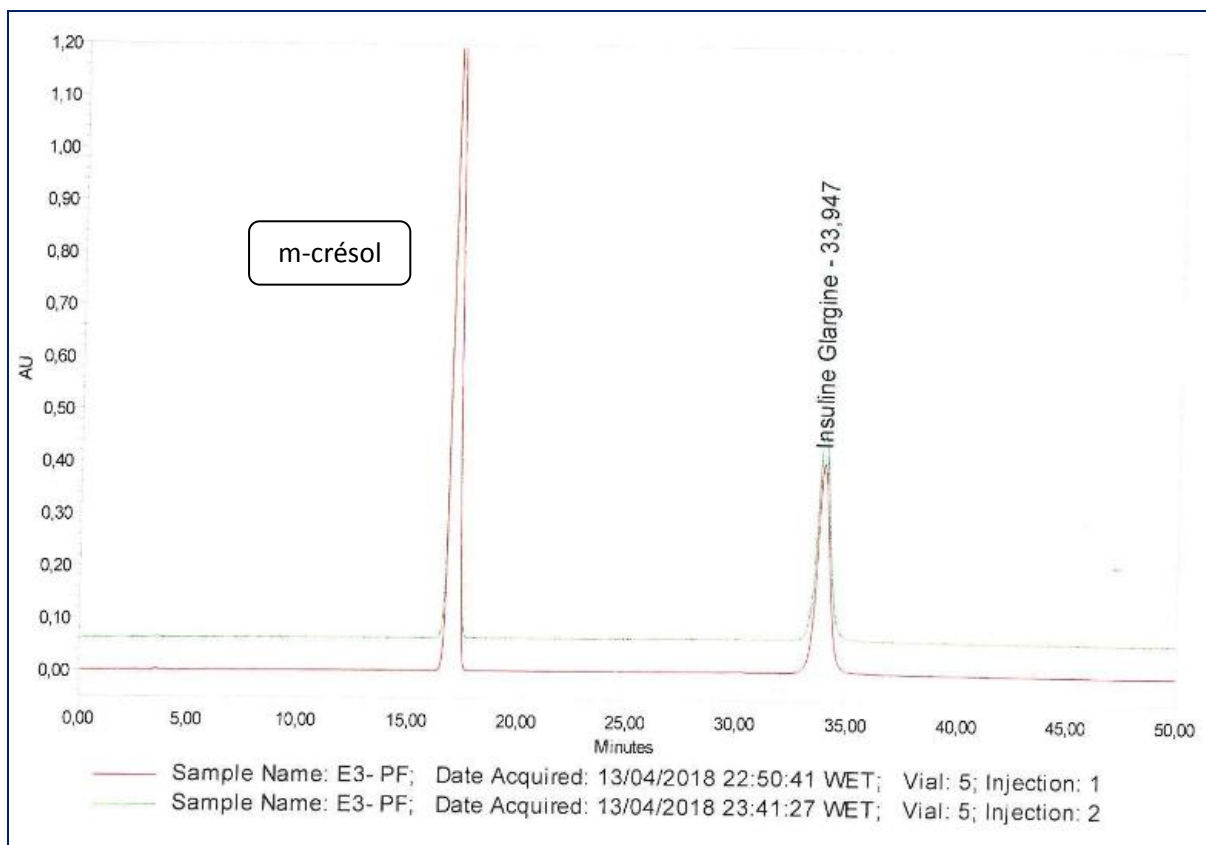
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Int Type	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	E1- PF	3	2	Insuline Glargine	33,933	15580830	100,00	398449	BB	1,968097e+004	9,431538e-001
2	E1- PF	3	1	Insuline Glargine	33,921	15611585	100,00	397680	BB	1,947461e+004	9,458759e-001
Mean					33,927	15596207,5	100,0				
Std. Dev.					0,009	21747,0	0,0				
% RSD					0,03	0,1	0,0				



**Figure 21: chromatogramme de solution d'essai 2 à 214 nm.**

**Tableau 11: résultats d'injection de solution d'essai 2.**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Int Type	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	E2- PF	4	2	Insuline Glargine	33,929	15488604	100,00	396477	BB	1,965964e+004	9,452019e-001
2	E2- PF	4	1	Insuline Glargine	33,928	15518514	100,00	396636	BB	1,968762e+004	9,516990e-001
Mean					33,929	15503558,9	100,0				
Std. Dev.					0,001	21150,0	0,0				
% RSD					0,00	0,1	0,0				



**Figure 22: chromatogramme de solution d'essai3 à 214 nm.**

**Tableau 12:Tableau : résultats d'injection de solution d'essai 3.**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Int Type	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	E3- PF	5	2	Insuline Glargine	33,944	15694853	100,00	399067	BB	1,939338e+004	9,455547e-001
2	E3- PF	5	1	Insuline Glargine	33,947	15675053	100,00	398863	BB	1,940203e+004	9,372940e-001
Mean					33,946	15684953,1	100,0				
Std. Dev.					0,002	14001,0	0,0				
% RSD					0,01	0,1	0,0				

**4. Critère d'acceptation :**

La teneur d'Insuline Glargine doit être entre [95.0 → 105.0IU/ml]

**Formule de calcul :**

$$IG(IU/ml) = \frac{\text{Moyenne des aires IG essai} \times \text{dilution essai} \times \text{masse pesés STD} \times \text{titre STD} \times (100 - LOD)}{\text{Moyenne des aires IG STD} \times \text{dilution STD} \times 100 \times 0.036378 \times 100}$$

Avec : moyenne des aires IG essai (tableau 10, 11,12).

Dilution essai : 2.5.

Masse pesés STD : 15.972

Titre STD : 98.1

LOD : 4.35

Dilution STD :10

### 5. Résultats de calcul :

Essaie 1 :

$$\text{IG (IU/ml)} = \frac{15596207.5 \times 2.5 \times 15.972 \times 98.1 (100-4.35)}{15892816.5 \times 10 \times 100 \times 0.036378 \times 100}$$
$$= 101.07 \text{ IU/ml}$$

Essaie 2 :

$$\text{IG (IU/ml)} = \frac{15503558.9 \times 2.5 \times 15.972 \times 98.1 (100-4.35)}{15892816.5 \times 10 \times 100 \times 0.036378 \times 100}$$
$$= 100.47 \text{ IU/ml}$$

Essaie 3 :

$$\text{IG (IU/ml)} = \frac{15684953.1 \times 2.5 \times 15.972 \times 98.1 (100-4.35)}{15892816.5 \times 10 \times 100 \times 0.036378 \times 100}$$
$$= 101.64 \text{ IU/ml}$$

$$\text{Moyenne essaie} = \frac{303.19}{3}$$
$$= 101.06 \text{ IU/ml}$$

**Discussions :** on conclue que la teneur en Insuline Glargine obtenue pour les trois solutions d'essai est conforme à la spécification.

## IV. Dosage de substances apparentées :

Le but de ce dosage permet de déterminer la teneur en impureté présente dans le produit fini. Nous allons utiliser les mêmes conditions chromatographiques que celle utilisées pour le dosage du principe actif, ainsi que les mêmes phases mobiles et la même solution de résolution.

## 1. La conformité du système :

### 1.1 Les critères d'acceptation :

- Le facteur de symétrie du pic principal de la solution de référence  $FS \leq 2$ .
- le nombre des plateaux théoriques  $N_{th} \geq 5000$ .

### 1.2 Résultats et discussion :



Figure 23: chromatogramme de solution de référence

#### Résultats :

- ✓ Le facteur de symétrie est de  $1,17 \leq 2$ .
- ✓ Le nombre des plateaux théorique  $N_{th} = 56188 \leq 5000$ .

Donc les résultats obtenus sont valide (annexe 2).

Après la vérification de conformité du système, on injecte les trois solutions d'essais, les résultats trouvés sont les suivants :

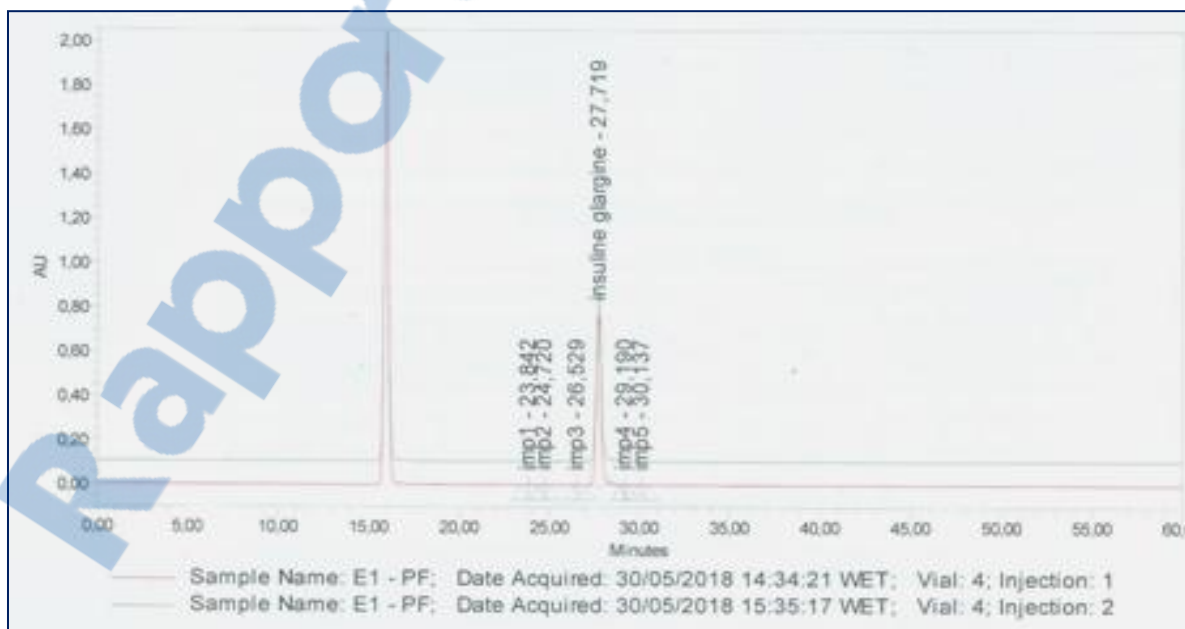
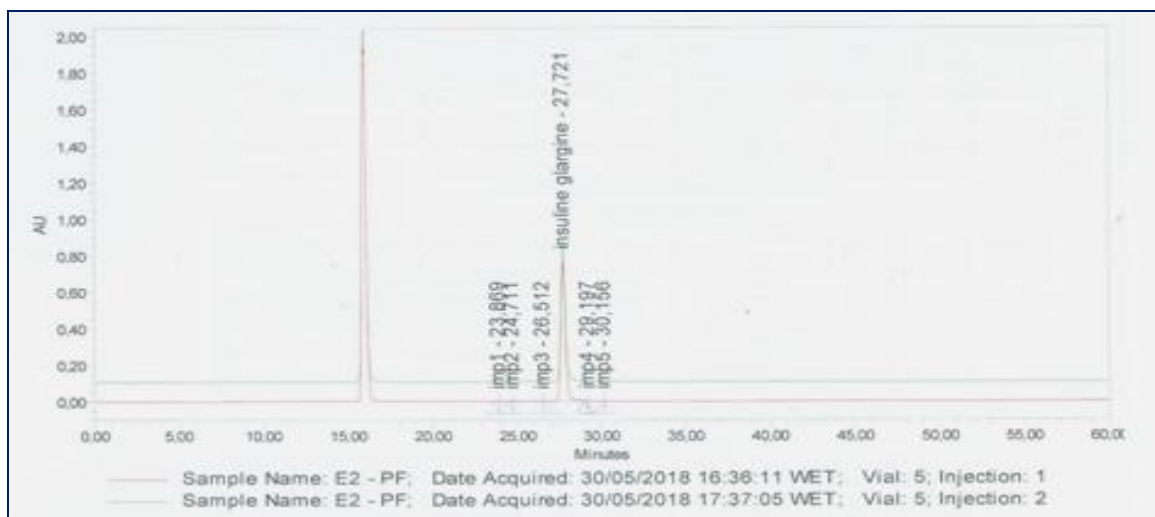
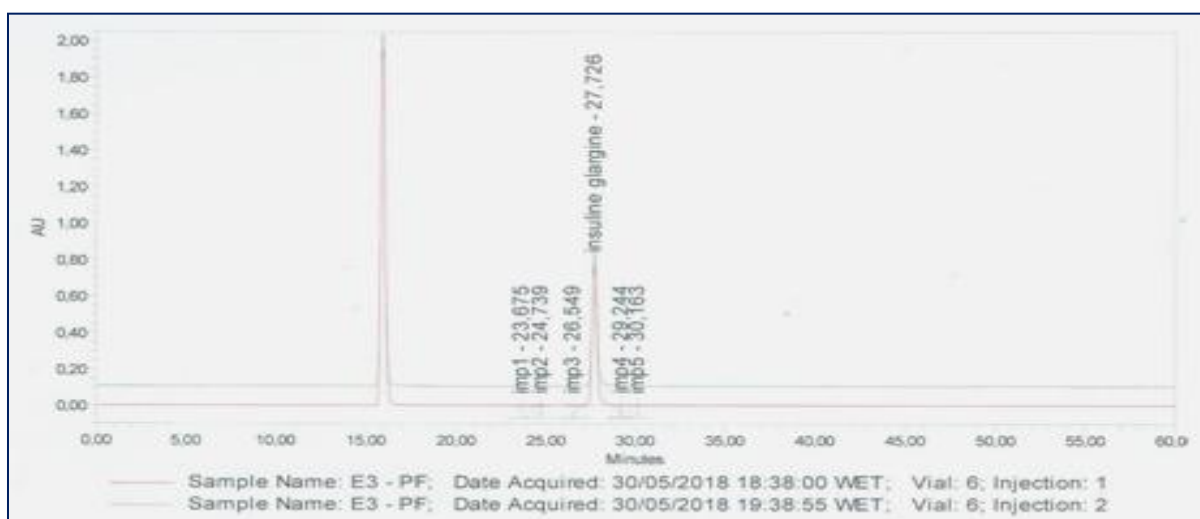


Figure 24 : chromatogramme du dosage des impuretés dans l'essai 1



**Figure 25: chromatogramme du dosage des impuretés dans l'essai 2**



**Figure 26: chromatogramme du dosage des impuretés dans l'essai 3**

**Critère d'acceptation :**

Le pourcentage des impuretés est inférieur à 2%.

**Résultats :**

**Tableau 13 : résultats de dosage des impuretés en %**

	Imp 1	Imp 2	Imp 3	Imp 4	Imp5
Essai 1	<b>0.06</b>	<b>0.13</b>	<b>0.06</b>	<b>0.03</b>	<b>0.07</b>
Essai 2	<b>0.05</b>	<b>0.11</b>	<b>0.06</b>	<b>0.04</b>	<b>0.09</b>
Essai 3	<b>0.04</b>	<b>0.12</b>	<b>0.07</b>	<b>0.04</b>	<b>0.06</b>

Donc les résultats de dosage obtenu pour les trois solutions d'essai sont inférieurs à 2% (Annexe 2).



## Partie 2 : Dosage d'Insuline Glargine dans la deuxième spécialité pharmaceutique

### I. Le but :

Le but de cette procédure analytique est d'identifier l'Insuline Glargine par la méthode d' HPLC. La détection est réalisée par absorption UV à une longueur d'onde de 214 nm pour l'Insuline Glargine.

### II. Matériels et méthodes :

#### 1. liste des réactives:

- Acétonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )
- acide chlorhydrique( $\text{HCl}$ )
- acide phosphorique (85%) ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )
- l'eau dibistillée ( $\text{H}_2\text{O}$ )
- sodium azide ( $\text{NaN}_3$ )
- chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ )
- sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ou ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) ou ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).

#### 2. Standards de références :

Tableau 14: standards de références.

Référence standard/Référence matériel	Description
Insuline Glargine	Standard de référence
0 <sup>A</sup> -Arg-Insuline Glargine	Matériel référence
m-crésol	Standard de référence

#### 3. Préparation des solutions:

##### ➤ 10mg/ml Sodium azide solution

On dissout 200mg de sodium azide dans 20ml de l'eau bidistillée, la concentration de la solution est 10mg /ml.

##### ➤ acide chlorhydrique0.01mol/l:

On dilue 100 $\mu\text{l}$  d'acide chlorhydrique de 12mol/l avec l'eau bidistillée jusqu'à 120ml. Pour avoir une concentration de 0.01 mol/l.

##### ➤ acide chlorhydrique0.1 mol/l:

On dilue 1mL d'acide chlorhydrique de 12mol/l avec l'eau bidistillée jusqu'à 120ml. Pour avoir une concentration de 0.1mol/l.

#### 4. Préparation des phases mobile

##### ➤ Solution tampon pH 2.5 :

On dissout 20.7g de sodium dihydrogène phosphate dans 900ml d'eau bidistillée, on ajuste le pH à 2.5 par l'acide phosphorique (85%), et on complète à 1000ml avec de l'eau bidistillée.

➤ **Phase mobile A :**

On dissout 18.4g de chlorure de sodium dans 250ml de la solution tampon 2.5, 400ml d'eau bidistillée et 250ml d'acetonitrile, on apporte la solution à température ambiante et on complète à 1000ml par l'eau bidistillée.

➤ **Phase mobile B :**

On dissout 3.2 g de chlorure de sodium dans 250 ml de solution tampon, 650ml d'acetonitrile. On apporte la solution à température ambiante et on complète à 1000ml avec l'eau bidistillée.

**Tableau 15: programme d'élution**

Temps (min)	Phase mobile A%	Phase mobile B%
0	96	4
0 à 20	83	17
20à30	63	37
30à40	96	4
40à50	96	4

## 5. Préparation des standards

➤ **Solution standard de m-crésol :**

A1: On dissout 40 mg de m-crésol standard, dans 50mL d'eau bidistillée.

NB : on prépare de la même façon trois solutions A1, A2, A3.

➤ **Solution standard :**

On dissout 33mg de standard d'Insuline Glargine, dans 3ml d'HCl 0.01 mol/l, 10ml de solution A1, 20µl de sodium azide, et on complète à 20ml avec l'eau bidistillée.

La concentration théorique finale est de 1.65 mg/ml d'Insuline Glargine, et de 0.4mg/ml de m-crésol.

NB : on prépare de la même façon trois solutions S1, S2, S3.

## 6. Solution d'essai :

On mélange le contenu de 2 cartouches, et on prélève 1,5 ml du mélange et on complète à 10ml avec l'eau bidistillée.

## 7. La conformité du système :

On dissout 15mg de standard d'Insuline Glargine, dans 1.5 ml d'acide chlorhydrique, 0.75mg de 0<sub>A</sub>-Arg-Insuline Glargine et on complète à 10 ml avec l'eau bidistillée.

➤ **Préparation de 0<sub>A</sub>-arg-insuline :**

On prend 0.75 mg de 0<sub>A</sub>-Arg-Insuline Glargine, et on dissout par l'ajout de 750µl de 0.01mol/l d'HCl, l'ampoule est rincée avec 750µl d'HCl 0.01 mol/l et on complète à 10ml avec HCl 0.01 mol/l.

## 8. Les conditions chromatographiques :

Le tableau suivant se résume les conditions chromatographiques utilisées pour dosage d'Insuline Glargine, dans ce cas 276nm et la longueur d'onde d'une absorption maximal du principe active

**Tableau 16: conditions chromatographiques**

<b>Colonne</b>	Colonne (3*250) et équivalent de 250 mm de longueur et 3 mm de diamètre interne.
<b>Longueur d'onde</b>	276nm
<b>Volume injecté</b>	5µL
<b>Le temps d'analyse</b>	50min
<b>Température de la colonne</b>	+35°C±2°C
<b>Température de l'échantillon</b>	+2°Cà+8°C
<b>Détecteur(UV)</b>	214nm pour l'Insuline Glargine 275nm pour m-crésol

## 9. La séquence d'injection typique :

La séquence d'injection utilisé pour se dosage est la suivante :

**Tableau 17: séquences des injections**

Injection	Numéro d'injection
Blanc	1
SST	2
Standard S1/S2/S3	1 pour chaque solution
Solution de référence	1
Solution d'essai	11 maximums
Standard S1/S2/S3	1 pour chaque solution
SST	1
Solution d'essai	12 maximums
Standard S1/S2/S3	1 pour chaque solution
SST	2

## III. Evaluation :

### 1. Conformité du système :

Critère d'acceptation :

- le temps de rétention du pic d'Insuline Glargine doit être entre 18 et 23 min.
- la résolution calculée entre l'Insuline Glargine et 0<sub>A</sub>-Arg-Insuline Glargine doit être  $R \geq 1.5$ .
- le coefficient de variation RSD  $\leq 2\%$ .

## 2. Resultats et discussion :

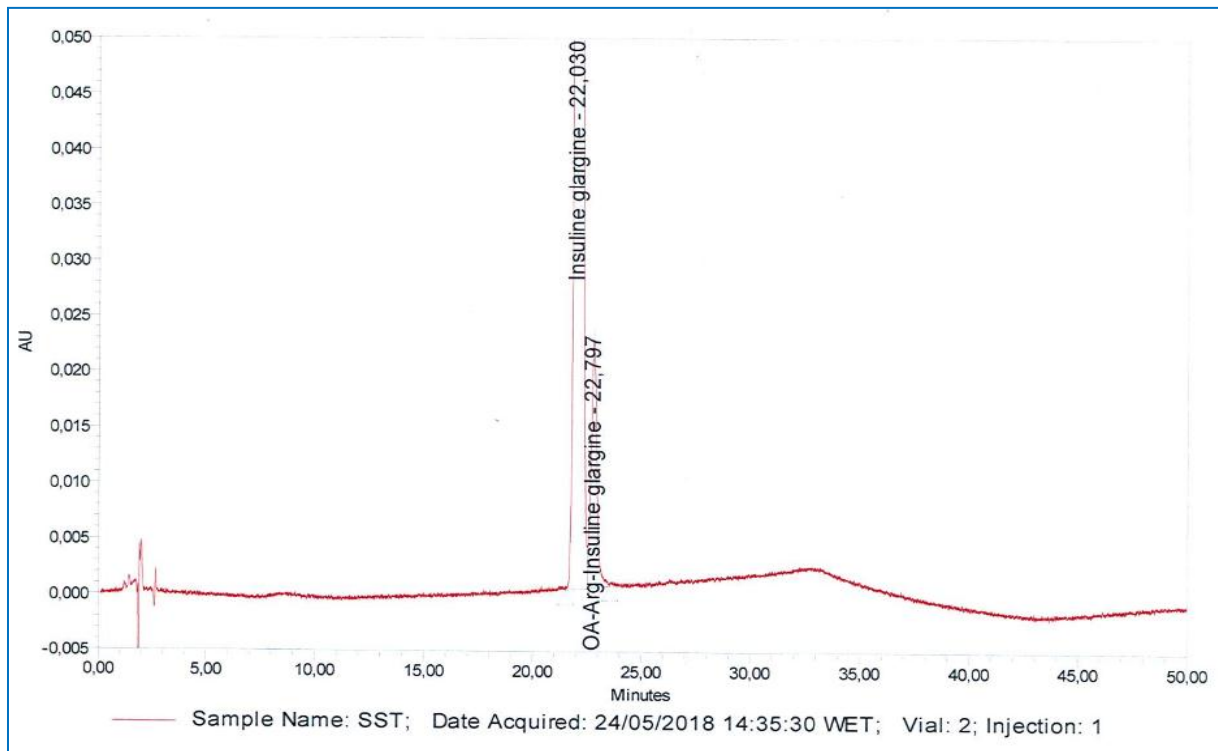


Figure 27: chromatogramme d'Insuline Glargine et 0<sub>A</sub>-Arg-Insuline Glargine à 215 nm

### Résultats

- d'après le chromatogramme obtenu, le temps de rétention du pic d'Insuline Glargine et de 0<sub>A</sub>-Arg- Insuline Glargine est entre 18 et 23 min (figure 27).

- la résolution: on a

$$R = \frac{1.18 \times (t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}$$
$$= \frac{1.18 \times (22.797 - 22.030)}{0.35 + 0.15} = 1.8$$

- Donc la résolution calculée entre l'Insuline Glargine et le 0<sub>A</sub>-Arg-insuline est conforme à la spécification.

## 3. Exigence de standard solution :

### 3.1 Critère d'acceptation :

-Le facteur de symétrie calculé doit être  $\leq 1.8$ .

- facteur de réponse est calculé par le rapport entre la surface du pic et la concentration final selon la formule suivante :

$$RF = B/C$$

B : la surface du pic de solution standard

C : la concentration respective de standard

Le coefficient de variation (RSD) du facteur de réponse calculé doit être  $RSD \leq 2\%$ .

### 3.2 Résultats et discussions :

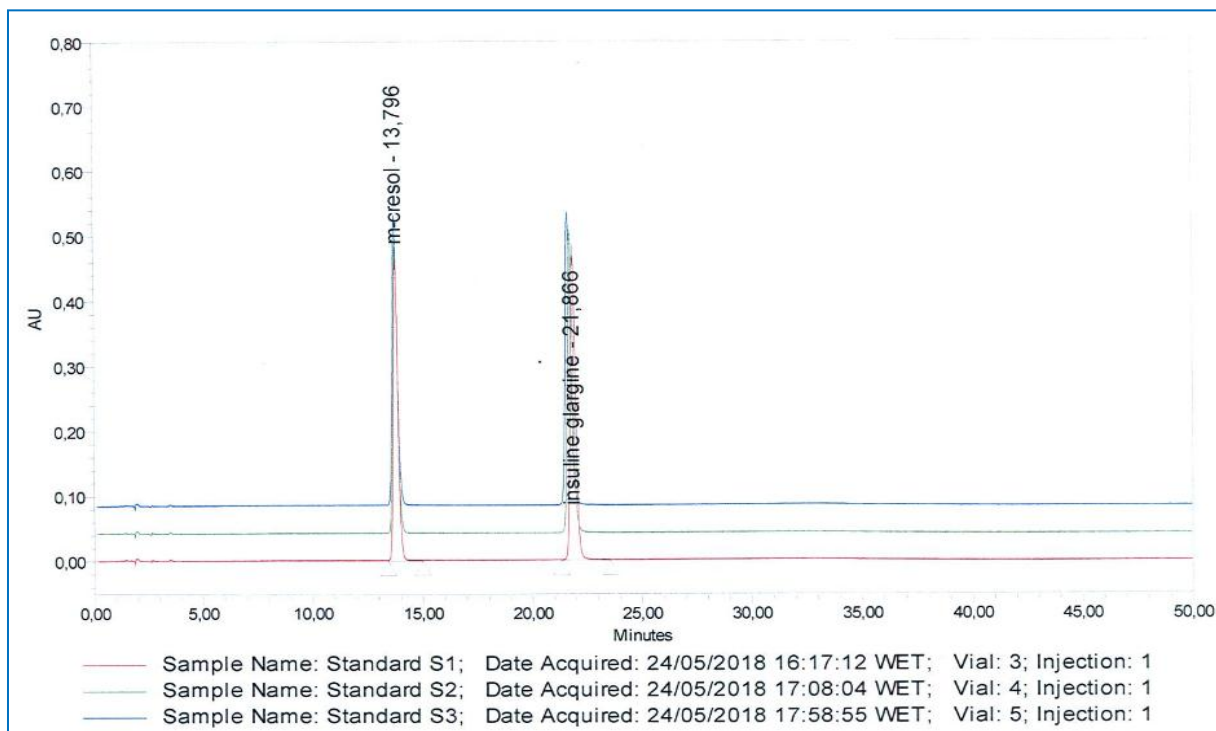


Figure 28: Chromatogramme du standard d'Insuline Glargine à 215 nm

Tableau 18: résultats d'injection de standard d'Insuline Glargine

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Int Type
1	Standard S1	3	1	insuline glargine	21,866	8069155	54,40	469085	BB
2	Standard S2	4	1	insuline glargine	21,748	7942775	54,53	463199	BB
3	Standard S3	5	1	insuline glargine	21,654	7751066	53,59	451953	BB
Mean					21,756	7920998,9			
Std. Dev.					0,106	160158,6			
% RSD					0,49	2,0			

#### Résultats :

- Pour le calcul de Facteur de Symétrie:

On a :

$$FS = W0.05/2f$$

$$FS = 0.12/2 \times 0.05 = 1.2$$

Le facteur de symétrie calculé est :  $FS=1.2 \leq 1.8$

➤ calcul du facteur de réponse pour les trois standards d'Insuline Glargine

Tableau 19: résultats de calcul de facteur de réponse

La surface des pics	Concentration STD (mg/ml)	Facteur de réponse
8069155	1.665	4847795,13
7942775	1.652	4807975,18
7751066	1.662	4663697,95

Donc :

$$\text{RSD} = \frac{S}{M} \times 100$$

$$= 96861,8597 / 4773156,09$$

$$= 0,01929304 \times 100 = 1.9\%$$

S: écart-type  
M: la Moyenne

- Le coefficient de variation RDS est  $\leq 2\%$

**Donc les résultats obtenus sont conformes aux normes données par le dossier technique.**

#### 4. La teneur en Insuline Glargine :

La teneur en Insuline Glargine dans chaque solution d'essai est déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage linéaire basée sur les surfaces du pic d'Insuline Glargine et la concentration de trois solutions standards.

Le contenu est calculé selon l'une des formules suivantes :

$$\frac{AT}{A} \times 6.67 = C_{PL}$$

Equation pour la détermination de la teneur en Insuline Glargine en négligeant la concentration de la solution standard.

$$\frac{AT}{A100} \times 6.67 \times CR = C_{PL}$$

Equation pour la détermination de la teneur en Insuline Glargine ne pas avoir pris en compte de la concentration de la solution standard.

AT : la surface de pic d'Insuline Glargine dans la solution s'essai.

A : la pente de la courbe d'étalonnage.

6.67 : facteur de dilution.

C<sub>PL</sub> : la concentration d'Insuline Glargine dans la solution d'essai en (mg/ml).

CR : le contenu de standard en %.

La formule pour convertir la teneur en Insuline Glargine de mg/ml en U/ml

$$CT \text{ (mg/ml)} \times 27.48914 \text{ (U /mg)} = \text{U/ml}$$

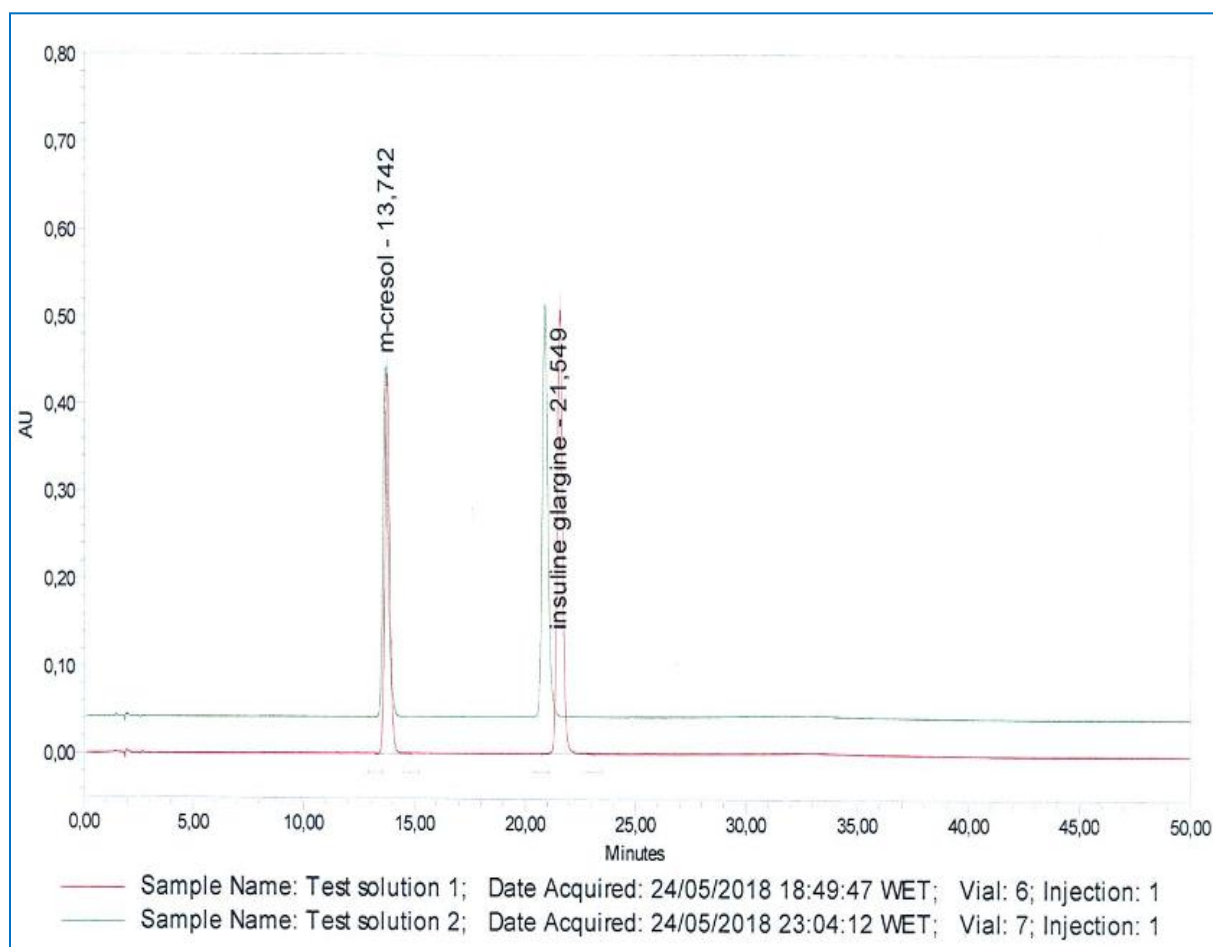
CT : la concentration d'Insuline Glargine en mg/ml.

27.48914 Unités correspond à 1 mg de substance médicamenteuse d'isulineglargine.

#### 4.1 Critère d'acceptation :

- la teneur en Insuline Glargine : doit être entre 9.82 - 11.46 mg/ml  $\iff$  270-315 U/ml

## 4.2 Résultats et discussions :



**Figure 29: chromatogramme de solution d'essai à 215 nm pour la détermination d'Insuline Glargine**

**Tableau 20: résultat du dosage d'Insuline Glargine à 215 nm**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Int Type
1	Test solution 1	6	1	insuline glargine	21,549	8678918	56,57	509856	BB
2	Test solution 2	7	1	insuline glargine	20,875	8297520	56,58	471364	BB
Mean					21,212	8488219,1			
Std. Dev.					0,477	269688,8			
% RSD					2,25	3,2			

## 5. la courbe d'étalonnage :

Pour déterminer la courbe d'étalonnage on prend les aires des pics des trois standards S1, S2, S3 en fonction de la concentration

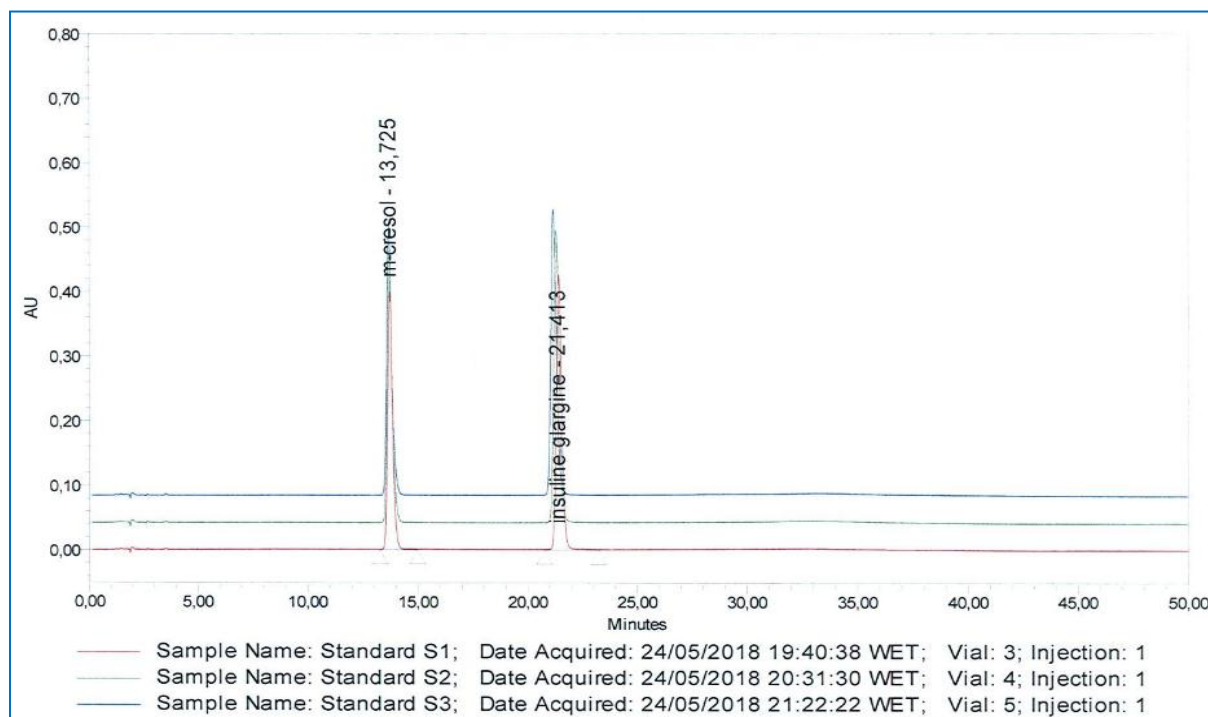


Figure 30: chromatogramme du standard d'Insuline Glargine à 215nm

Tableau 21: surface des pics du standards d'Insuline Glargine et leurs concentrations

La concentration du STD (mg/ml)	La surface de pic
1.6645	7707739
1.652	7896018
1.662	7696218

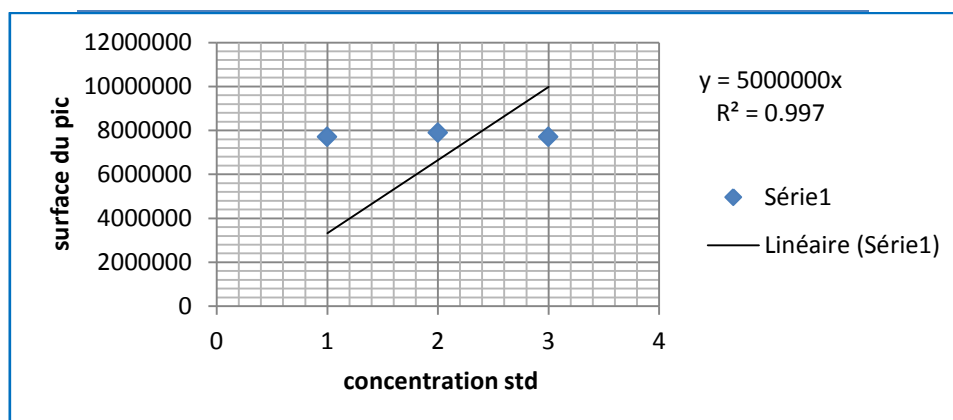


Figure 31: courbe d'étalonnage d'Insuline Glargine



Donc la pente d'Insuline Glargine :  $Y=5 \times 10^6 x$

### 6. Le calcul de teneur en Insuline Glargine:

On a la relation de calcul de la teneur en Insuline Glargine est :

$$\frac{AT}{A100} \times 6.67 \times CR = C_{PL}$$

$$C_{\text{insuline}} = \frac{8678918 \times 6.67 \times 0.939}{5 \times 10^6} = 10.87 \text{ mg/ml}$$

$$C_{\text{insuline}} = \frac{8297520 \times 6.67 \times 0.939}{5 \times 10^6} = 10.39 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Moy} = 10.63 \text{ mg/ml}$$

➤ Pour convertir la teneur d'Insuline Glargine du mg /ml en U/ml

$$\begin{aligned} C_{\text{insuline}} &= 10.63 \times 27.48914 \\ &= 292.20 \text{ U/ml} \end{aligned}$$

### 7. Discussions :

La teneur en Insuline Glargine calculée par ce dosage, entre dans les normes du dossier technique. Donc les résultats obtenus sont résultats conformes.

### 8. Discussion des résultats :

Finalement, tous les résultats obtenus suite à l'étude physico-chimique de ces deux spécialités pharmaceutiques dont le principe actif est l' Insuline Glargine, sont en parfaite concordance avec les limites définies dans le dossier technique. Ceci montre parfaitement que le médicament étudié est conforme et répond à toutes les conditions, ce qui lui permettra d'être commercialisé sur le marché.

## Conclusion:

Depuis longtemps la démarche qualité est devenue une priorité dans tous les domaines d'activité, le domaine de la santé publique n'échappe pas à cette évolution. Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments prend toutes les mesures de contrôle pour que l'efficacité et la sécurité des médicaments soient acceptables car c'est le seul organisme qui s'occupe de la qualité des médicaments au Maroc.

Durant notre stage nous avons participé au contrôle de deux spécialités pharmaceutiques (à base d' Insuline Glargine). Les résultats obtenus ont montré que ces deux médicaments sont conformes aux normes fixées dans le dossier technique. Et donc la société pharmaceutique a le droit d'acquiescer une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Ce travail nous a permis d'améliorer nos connaissances acquises durant les études que nous avons reçues au niveau de la faculté des sciences et techniques, de développer nos capacités d'initiative et d'autonomie et de s'adapter avec le milieu professionnel. En outre, il nous a permis de bien maîtriser quelques techniques analytiques qui présentent un intérêt majeur dans le domaine pharmaceutique, et surtout d'éclaircir nos visions des exigences du contrôle qualité qui ne se conçoit pas comme un ensemble figé de méthodes expérimentales, mais comme un concept dynamique appelé constamment à évoluer.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- [1]. pharmacopée européenne : monographie numéro 01/2011 :0838.  
Corrigés 8.6 : Insuline humaine.
- [2]. Pharmacopée européenne : monographie numéro 01/2008 :2084.  
Corrigés 6.0 : Insuline Asparte.
- [3]. European Medicines Agency (2013, May 22). Biosimilar medicines. revrieved  
jun 17, 2015.
- [4]. Agin, A., et R. Sapin. 2010. « Analogues et dosages d'insuline : le cas général et le cas particulier de la glargine ». *Médecine Nucléaire*, 4e symposium bioclinique - Diabète, 34 (10): 571-82.  
<https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2010.07.014>.
- [5]. European Medicines Agency (2013, May 22). Biosimilar medicines. revrieved  
jun 17, 2015.
- [6].DR G. DOLLO, Maitre de conférences des universités « définition, Statut et Description des Médicaments et autre produits de santé ».Université de Rennes 1-praticien Hospitalier-CHU de Rennes.
- [7]-Source interne de LNCM.2007-2008, Rabat ( médicament générique)
- [8] ANSM. Les médicaments génériques : des médicaments à part entière.[en lignes].disponible sur :<  
[http://ansm.sante.fr/content/download/45165/585839/version/2/file/Ansm\\_Rapport\\_Generiques\\_Decembre2012-v2.pdf](http://ansm.sante.fr/content/download/45165/585839/version/2/file/Ansm_Rapport_Generiques_Decembre2012-v2.pdf)>[ consulté le 20/12/2012].
- [9].DE BEER D, GUTWIRTH. S et STENGERS.I, (2011), Brevet, Santé publique et accès aux médicaments essentiels, EDIDTION Emile Bruylant, France, 662 p.
- [10].European Medicines Agency (2013, May 22). Biosimilarmedicines. Retreivedjune  
17,2015.
- [11] D. Hoch et P. Tambourin, « Les biotechnologies, clés de l'innovation thérapeutique dans le domaine de la santé », *médecine/sciences*, vol. 25, p. 13-17, févr. 2009.
- [12].Commission européenne « Ce qu'il faut savoir sur les médicaments biosimilaires » processus sur la responsabilité d'entreprise dans le domaine des produits pharmaceutique. Accès aux médicaments en Europe. Un document consensuel d'information 2013.
- [13]. Encyclopédie médical pratique copyright c 1994, 1995, 1996, 1997 The Learning Company Inc. TLC-Edusoft.

- [14] .« Formation Les impuretés dans les produits pharmaceutiques : principes actifs et produits finis : réglementation, spécifications et aspects analytiques ». s. d. Consulté le 20 avril 2018.
- [15] A.FEROYARD, ‘constituions d’un dossier d’autorisation de mise sur le marché d’un médicament a usage humaine et ses différentes procédures médecine et de pharmacie, 2014’’. Thèse de doctorat : pharmacie. UNIVERSITE DE ROUEN, U.F.R DE MEDECINE ET DE PHARMACIE, 2014,183p.
- [16] « Insuline ». *Wikipédia*,23 mai 2018. <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Insuline&oldid=148784291>.
- [17] A. Agin et R. Sapin, « Analogues et dosages d’insuline : le cas général et le cas particulier de la glargine », *Médecine Nucl.*, vol. 34, n° 10, p. 571- 582, oct. 2010.
- [18] . Verge D. Insulinothérapie : nouvelles molécules et voies d’administration. *Med Sci (Paris)* 2004;20:986–98
- [19] « Lantus - Utilisations, Effets secondaires, Interactions - canoe.ca ». [En ligne]. Disponible sur: <http://sante.canoe.ca/drug/getdrug/lantus>. [Consulté le: 25-mai-2018].
- [20]. Agin, A., et R. Sapin. 2010. « Analogues et dosages d’insuline : le cas général et le cas particulier de la glargine ». *Médecine Nucléaire*, 4e symposium bioclinique - Diabète, 34 (10): 571-82. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2010.07.014>.
- [21] « VIDAL - Insuline glargine ». [En ligne]. Disponible sur: [https://www.vidal.fr/substances/20401/insuline\\_glargine/](https://www.vidal.fr/substances/20401/insuline_glargine/). [Consulté le: 25-mai-2018].
- [22]. Chatterjee S, Tringham JR, Davies MJ. Insulin glargine and its place in the treatment of types 1 and 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7:1357–71.
- [23] . « 23-insulines-preparation-galeniques.pdf ». .
- [24] . Madsbad S. Insulin analogues: have they changed insulin treatment and improved glycaemic control *Diabetes Metab Res Rev* 2002;18:S21–8.
- [25]. M.Caude and A.Jardy,chromatographie en phase liquide:Introduction, Technique de l’ingenieur,traité Analyse et caractérisation PE 1, 1996,1-6.
- [26]. Professeur Jean-Louis Cuq. Cours chromatographie liquide, Université Montpellier (2001), p4

[27]. R. Chandra<sup>1</sup>, K. Dutt, Sharma Department of Pharmaceutical Chemistry, Dolphin P.G. Institute of Biomedical and Natural Sciences, Dehradun-248001, Uttarakhand, INDIA, 2013

[28] : J.Dgraeve, F.Berthou, Méthodes chromatographiques, 2<sup>ème</sup> édition, (1986), p392

[29]: Dr Thierry Briere - Professeur agrégé – Département de Chimie, Université de La Réunion, (2001), p36-37

[30] Douglas A. Skoog, F.James Holler, Tiothy A. Nieman-Principes d'analyse instrumentale. 5<sup>ème</sup> édition. Amérique: de boeck, 2003, p 725.

[31] Audigié CL, Dupont G, Zonszain F, «Principes des méthodes d'analyse biochimiques», Doin Editeurs Paris tome 1, 1995, p 44.

[32] « Chromatographie en phase liquide à haute performance — Wikipédia.pdf ».

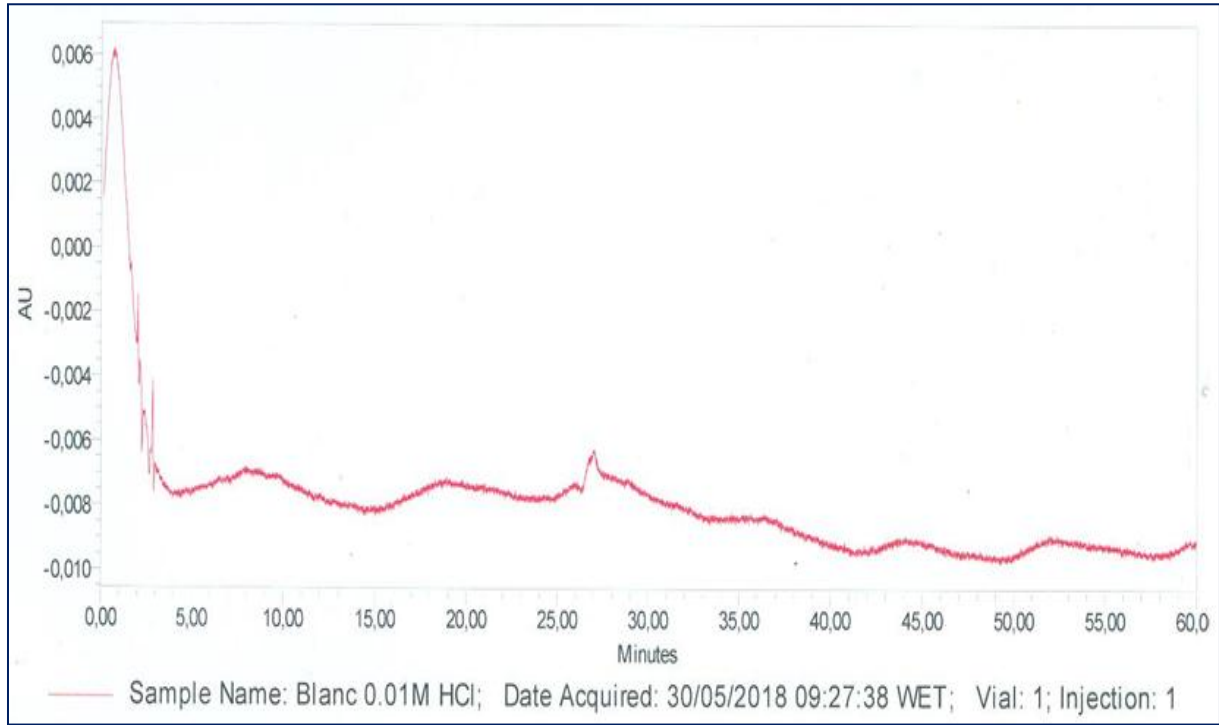
[33] TN-708-Automate-System-Suitability-Testing-TN70092-EN.Pdf

N.d. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN-708-Automate-System-Suitability-Testing-TN70092-EN.pdf>, accessed April 19, 2018.

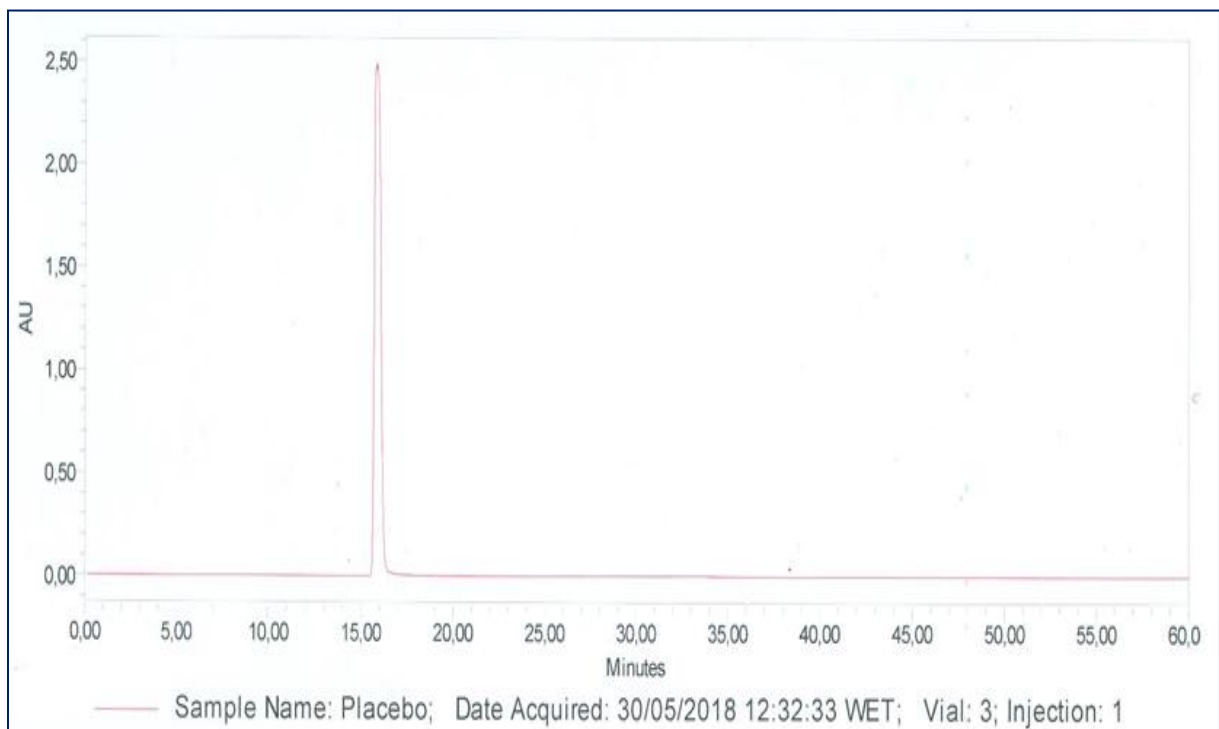
[34] C621\_1SUSP40.Pd N.d. [https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c621\\_1SUSP40.pdf](https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c621_1SUSP40.pdf), accessed April 24, 2018.

# Annexe :

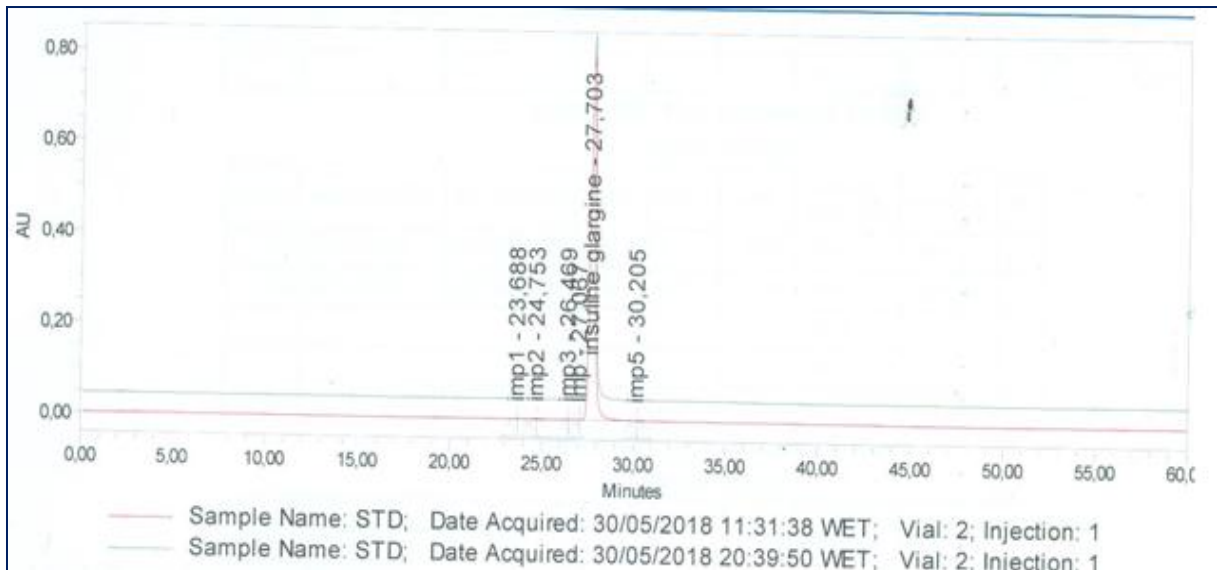
## Annexe 2 :



**Chromatogramme du blanc pour le dosage de substances apparentées**



**Chromatogramme du pic de placebo**



**Chromatogramme d'injection de standard**

**Peak Summary with Statistics**

Name: Peak5

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Int Type
1	STD	2	1	Peak5	30,156	Missing
Mean					30,156	
Std. Dev.						
% RSD						

**Peak Summary with Statistics**

Name: imp

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Int Type
1	STD	2	1	imp	27,067	5920	0,04	433	3,298149e+004	BV
2	STD	2	1	imp	27,139	8575	0,06	504	3,385322e+004	BV
Mean					27,103	7247,1				
Std. Dev.					0,051	1877,4				
% RSD					0,19	25,9				

**Peak Summary with Statistics**

Name: imp1

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	STD	2	1	imp1	23,688	12516	0,08	386	1,477640e+004	1,052284e+000	bb
2	STD	2	1	imp1	24,010	12229	0,08	339	4,598172e+003	6,316432e-001	bb
Mean					23,849	12372,5					
Std. Dev.					0,228	203,2					

### Peak Summary with Statistics

Name: imp1

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
% RSD					0,95	1,6					

### Peak Summary with Statistics

Name: imp2

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	STD	2	1	imp2	24,753	19963	0,13	1005	3,985842e+004	1,085424e+000	BB
2	STD	2	1	imp2	24,691	19719	0,13	1100	4,930159e+004	1,379904e+000	BB
Mean					24,722	19841,0					
Std. Dev.					0,044	172,2					
% RSD					0,18	0,9					

### Peak Summary with Statistics

Name: imp3

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	STD	2	1	imp3	26,469	8103	0,05	469	6,033314e+004	1,008897e+000	BB
2	STD	2	1	imp3	26,435	8892	0,06	564	6,635779e+004	1,422368e+000	BB
Mean					26,452	8497,6					
Std. Dev.					0,023	558,4					
% RSD					0,09	6,6					

Name: imp5

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	STD	2	1	imp5	30,138	10154	0,07	555	4,753390e+004		VB
2	STD	2	1	imp5	30,205	7243	0,05	425	5,844252e+004	9,884218e-001	bb
Mean					30,172	8698,7					
Std. Dev.					0,048	2058,7					
% RSD					0,16	23,7					

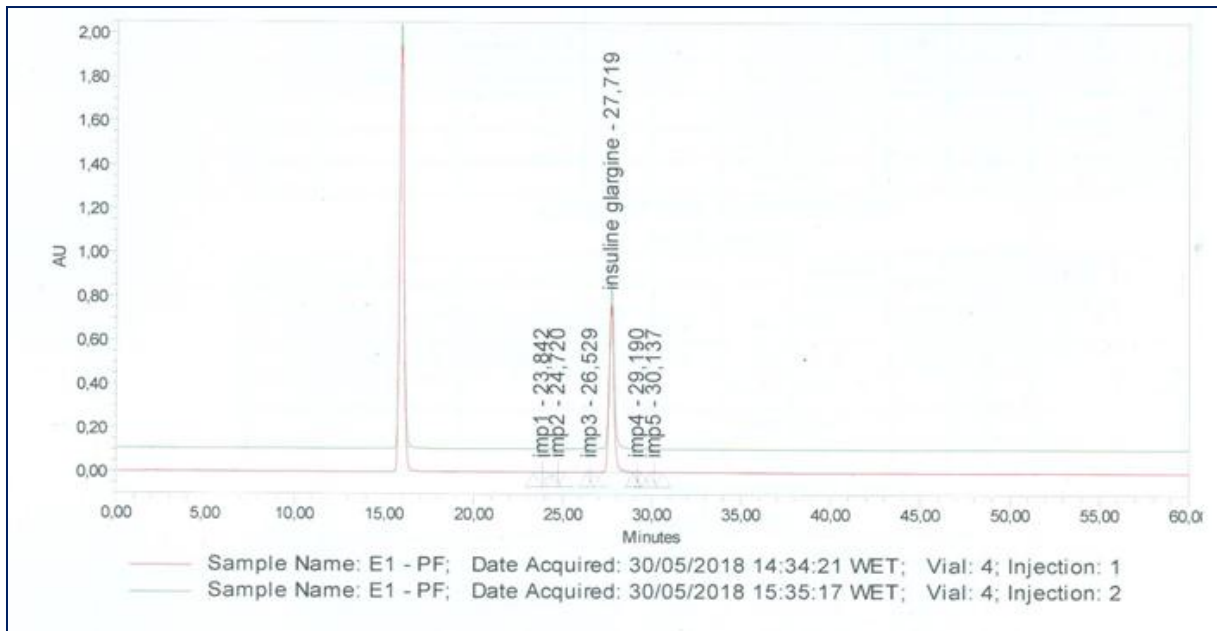
### Peak Summary with Statistics

Name: insuline glargine

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	STD	2	1	insuline glargine	27,703	14980489	99,64	804525	5,618828e+004	1,175157e+000	Vb
2	STD	2	1	insuline glargine	27,721	15126328	99,61	810122	5,637237e+004	1,178440e+000	VV
Mean					27,712	15053408,7					
Std. Dev.					0,013	103123,7					
% RSD					0,05	0,7					

**Tableaux des résultats l'injection du standard**





**Chromatogramme d'injection de l'essai 1**

**Peak Summary with Statistics**

**Name: imp1**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E1 - PF	4	2	imp1	24,031	8237	0,06	328	1,410191e+004	5,247392e-001	bb
2	E1 - PF	4	1	imp1	23,842	11482	0,08	373	1,238790e+004	9,087972e-001	bb
Mean					23,936	9859,5					
Std. Dev.					0,133	2295,0					
% RSD					0,56	23,3					

**Peak Summary with Statistics**

**Name: imp2**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E1 - PF	4	2	imp2	24,719	18671	0,13	1004	4,542978e+004	1,076487e+000	bb
2	E1 - PF	4	1	imp2	24,720	17701	0,12	999	4,393147e+004	1,098174e+000	bb
Mean					24,720	18186,0					
Std. Dev.					0,000	685,9					
% RSD					0,00	3,8					

**Name: imp3**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E1 - PF	4	1	imp3	26,529	7974	0,06	445	5,541100e+004	1,139445e+000	bb
2	E1 - PF	4	2	imp3	26,464	5703	0,04	443	2,357400e+005	1,234468e+000	bb
Mean					26,497	6838,3					
Std. Dev.					0,046	1606,1					
% RSD					0,17	23,5					

**Name: imp4**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E1 - PF	4	2	imp4	29,209	4262	0,03	414	6,597437e+004	8,434341e-001	bb
2	E1 - PF	4	1	imp4	29,190	6363	0,04	440	7,468355e+004	1,066215e+000	bb
Mean					29,199	5312,4					
Std. Dev.					0,013	1486,1					
% RSD					0,05	28,0					

**Name: imp5**

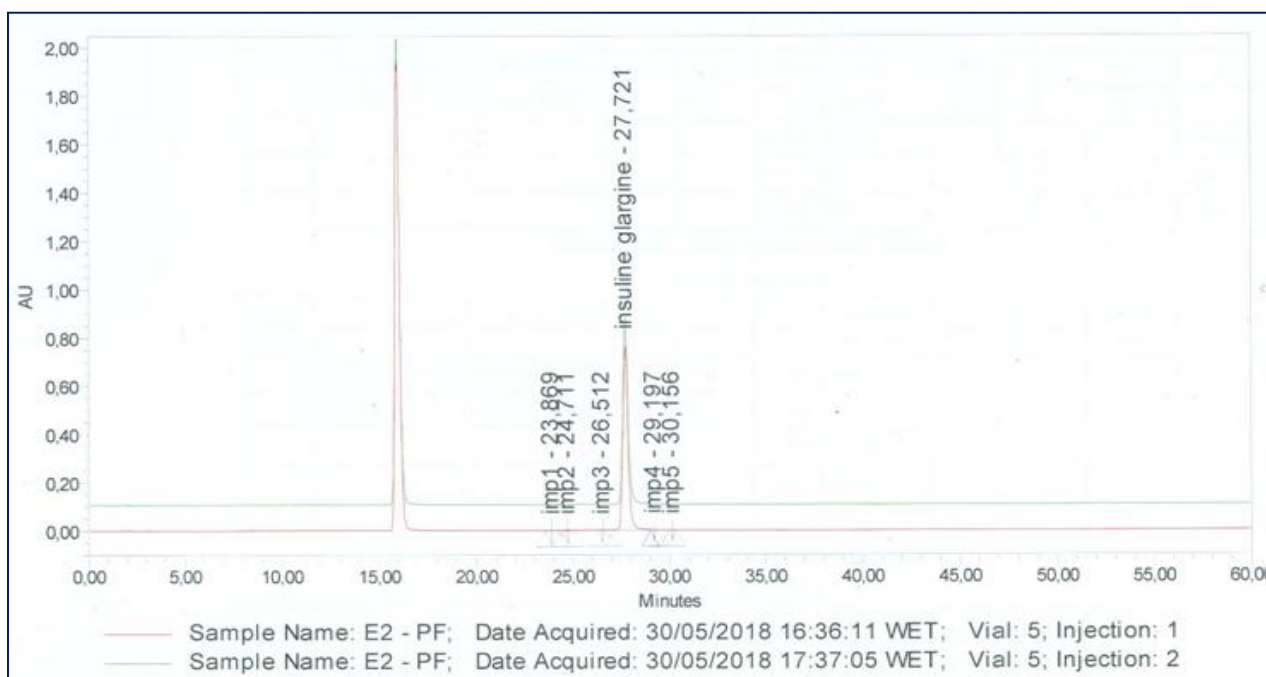
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E1 - PF	4	1	imp5	30,137	9731	0,07	458	2,713617e+004	1,481845e+000	bb
2	E1 - PF	4	2	imp5	30,185	8811	0,06	477	2,956989e+004	1,000863e+000	bb
Mean					30,161	9271,0					
Std. Dev.					0,034	650,1					
% RSD					0,11	7,0					

**Peak Summary with Statistics**

**Name: insuline glargine**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E1 - PF	4	2	insuline glargine	27,722	14298670	99,68	770876	5,613469e+004	1,153543e+000	bb
2	E1 - PF	4	1	insuline glargine	27,719	14167366	99,63	765735	5,637108e+004	1,163674e+000	bb
Mean					27,721	14233018,2					
Std. Dev.					0,002	92845,6					
% RSD					0,01	0,7					

**Tableaux des résultats d'essai 1**



**Chromatogramme d'injection d'essai 2**

**Name: imp1**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E2 - PF	5	1	imp1	23,869	7749	0,05	313	3,135122e+004	5,690483e-001	bb
2	E2 - PF	5	2	imp1	23,836	10114	0,07	331	1,835192e+004	5,173736e-001	bb
Mean					23,852	8931,3					
Std. Dev.					0,024	1672,4					
% RSD					0,10	18,7					

**Peak Summary with Statistics**

**Name: imp2**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E2 - PF	5	1	imp2	24,711	16329	0,11	937	5,175343e+004	1,274857e+000	bb
2	E2 - PF	5	2	imp2	24,698	19209	0,13	1033	4,653424e+004	1,021259e+000	bb
Mean					24,705	17769,0					
Std. Dev.					0,009	2036,3					
% RSD					0,03	11,5					

**Name: imp3**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E2 - PF	5	2	imp3	26,439	8468	0,06	471	6,553345e+004	1,313360e+000	bb
2	E2 - PF	5	1	imp3	26,512	6322	0,04	403	8,350961e+004	8,250442e-001	bb
Mean					26,475	7395,4					
Std. Dev.					0,052	1517,6					
% RSD					0,20	20,5					

**Name: imp4**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E2 - PF	5	2	imp4	29,203	6063	0,04	385	7,100873e+004	1,012007e+000	bb
2	E2 - PF	5	1	imp4	29,197	5047	0,04	422	7,221737e+004	9,806218e-001	bb
Mean					29,200	5554,7					
Std. Dev.					0,004	718,5					
% RSD					0,01	12,9					

**Peak Summary with Statistics**

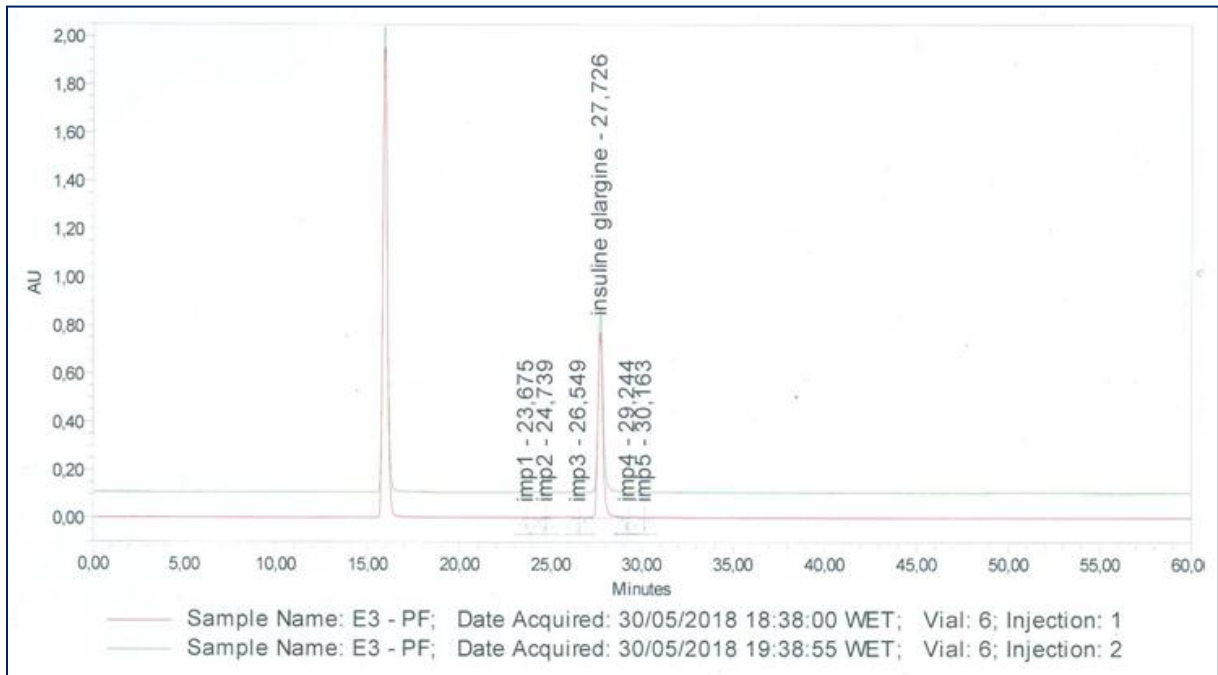
**Name: imp5**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E2 - PF	5	2	imp5	30,192	13213	0,09	585	1,485994e+004	9,207825e-001	bb
2	E2 - PF	5	1	imp5	30,156	5810	0,04	428	6,167209e+004	1,086037e+000	bb
Mean					30,174	9511,4					
Std. Dev.					0,025	5234,5					
% RSD					0,08	55,0					

Name: insuline glargine

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E2 - PF	5	1	insuline glargine	27,721	14246083	99,71	764567	5,583488e+004	1,171464e+000	bb
2	E2 - PF	5	2	insuline glargine	27,723	14238997	99,60	771216	5,679381e+004	1,171911e+000	bb
Mean					27,722	14242540,0					
Std. Dev.					0,001	5010,3					
% RSD					0,00	0,0					

Tableaux des résultats d'essai 2



Chromatogramme d'injection d'essai 3

Peak Summary with Statistics

Name: imp1

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E3 - PF	6	2	imp1	23,804	5205	0,04	271	3,543465e+005	1,306708e+000	bb
2	E3 - PF	6	1	imp1	23,675	7103	0,05	276	7,810113e+004	5,211140e-001	bb
Mean					23,739	6153,8					
Std. Dev.					0,091	1342,2					
% RSD					0,38	21,8					

Peak Summary with Statistics

Name: imp2

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E3 - PF	6	2	imp2	24,747	17248	0,12	1078	6,235007e+004	1,065862e+000	bb
2	E3 - PF	6	1	imp2	24,739	15321	0,11	1001	5,572500e+004	9,035630e-001	bb
Mean					24,743	16284,7					
Std. Dev.					0,006	1362,9					
% RSD					0,02	8,4					

**Name: imp3**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E3 - PF	6	1	imp3	26,549	9452	0,07	524	7,158602e+004	6,520477e-001	bb
2	E3 - PF	6	2	imp3	26,487	7227	0,05	477	2,220330e+005	1,108287e+000	bb
Mean					26,518	8339,5					
Std. Dev.					0,044	1573,4					
% RSD					0,16	18,9					

**Peak Summary with Statistics****Name: imp4**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E3 - PF	6	2	imp4	29,202	5091	0,04	359	7,397504e+004	1,172872e+000	bb
2	E3 - PF	6	1	imp4	29,244	5882	0,04	438	6,758755e+004	7,978080e-001	bb
Mean					29,223	5486,1					
Std. Dev.					0,030	559,2					
% RSD					0,10	10,2					

**Peak Summary with Statistics****Name: imp5**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E3 - PF	6	1	imp5	30,163	7494	0,05	434	2,561658e+004	9,089718e-001	bb
2	E3 - PF	6	2	imp5	30,163	9304	0,07	490	3,652982e+004	1,310349e+000	bb
Mean					30,163	8398,7					
Std. Dev.					0,000	1280,0					
% RSD					0,00	15,2					

**Name: insuline glargine**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor	Int Type
1	E3 - PF	6	2	insuline glargine	27,735	14246112	99,69	768008	5,641038e+004	1,176963e+000	bb
2	E3 - PF	6	1	insuline glargine	27,726	14261713	99,68	774457	5,716186e+004	1,161509e+000	bb
Mean					27,730	14253912,5					
Std. Dev.					0,007	11032,1					
% RSD					0,02	0,1					

**Tableaux des résultats d'essai 3**