REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR.YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



En vue de l'obtention du diplôme de Master II en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème :

Mise au point galénique d'un anti-histaminique Heptagyl 0.04 % ®, et l'étude de stabilité de ses conservateurs antimicrobiens *in vitro*

Soutenu publiquement le : 10 Septembre 2018

Présenté par : M^{r} Kiouane Takieddine Sofiane

Devant le jury :

M^{r} Nasri. R	Maître Assistant A	Président
M^{me} Bouherama. A	Maître Assistante A	Examinatrice
M^{me} Rouaki. F	Maitre de conférences B - Blida -	Promotrice
M^{lle} Boukara. K	Ingénieur d'Etat	Co-Promotrice

Année universitaire : 2017-2018


بسم الله الرحمن الرحيم

Remerciements

- A M[r] Nasri. R, Président du Jury et M[me] Bouherama. A, membre du Jury; pour m'avoir fait l'honneur de vérifier et apporter les correctifs et critiques que notre présente étude ne manquera pas de susciter.

- A notre Promotrice M[me] Rouaki Fayrouz Maitre de conférences à l'Université SAAD DAHLEB de BLIDA ;

  Que nous avons dû solliciter encore une fois dans l'âpre tâche de la réflexion et la recherche scientifique. Outre, ses précieuses orientations et sa guidance clairvoyante, je voudrai insister sur l'inestimable réconfort moral trouvé dans sa disponibilité et son humilité.

- A M[lle] Boukara Karima (Chef de Service au niveau du site de production SAIDAL Médéa) Co-Promotrice,

  Je lui témoigne plus que ma reconnaissance, ma sensibilité à sa bravoure et sa rigueur. Je crois avoir trouvé en elle les principaux attributs de « l'ainesse » : transmission du savoir, soutien dans les moments de difficulté, souci inlassable de l'acte objectivement et bien accompli.

- A M[r] Atsamnia chef de département de Biologie pour ; L'amabilité de l'accueil, l'indulgence de l'accompagnement, tout au cours de la présente année universitaire.

Kiouane Takieddine Sofiane

Dédicaces

- A mon cher **papa**, toujours présent : merci pour ton amour « magique », tes précieux conseils, ton aide et ton soutien.

- A ma chère **maman** notre « paradis » : tu arroses notre vie de joie et de bonheur ; merci pour tout ce que tu fais pour nous mama.

- A la plus gentille de toute, ma **sœur**, notre joie et fierté.

- A mon adorable **frère** et **ami**, l'homme fort de notre famille.

- A mon âme sœur : ma **femme**, qui m'accompagne, croit en moi et m'encourage toujours, merci d'être dans ma vie.

- A la mémoire de **mes grands parents paternels**. Ils ne sont plus de ce monde depuis quelques années déjà, mais l'amour dont ils m'ont nourri et les valeurs qu'ils m'ont transmises continueront d'être une source intarissable d'inspiration et de fierté.

- A **mes grands parents maternels**, dont le souci de la réussite scolaire de leurs petits enfants continue à habiter mes souvenirs comme une exigence perpétuelle à satisfaire.

- A **mes tantes** et oncles, beaucoup d'entre eux ont assumé les nobles fonctions de l'enseignement et de la formation ;
  Je leur suis aussi redevable de « la graine du savoir ». Qu'ils en soient remerciés.

- A **mes cousines** et **cousins**, la plupart d'entre eux sont plus jeunes que moi. J'espère qu'ils m'évoquent dans des références positives ;
  Je leur souhaite à tous pleins succès.

- A **mes amis**, tous mes amis, je leur suis reconnaissant de leur fidélité.

- A l'ensemble du personnel du département **Contrôle et Inspection** du Site de Production SAIDAL de Médéa.

Taky

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction……...1

Partie I : Etude bibliographique

I. Les allergies…….3

I.1. Définition de l'allergie.....4

I.2. Mécanisme de l'allergie…….....**.....**4

I.3. Définition de l'histamine.....**..**5

I.4. Les antihistaminiques…….....**.....**5

II. Définition du médicament…...…….…….....6

II.1. Définition du générique..……..……...7

II.2. Définition d'un principe actif……..……..…….…….....7

II.3. Définition d'un excipient…….…….....7

II.4. Pharmacie galénique.…….……..8

II.5. Les sirops……..……..……..….....8

II.6. Le sirop Heptagyl 0.04 % ®……..…….……..……..…….....8

II.6.1. La Cyproheptadine……..…….....**.....**9

II.6.2. Structure du Chlorhydrate de Cyproheptadine …….……...……..……..9

II.6.3. Pharmacodynamie de la Cyproheptadine ……..……10

II.6.4. Pharmacocinétique de la Cyproheptadine…….……10

III. La conservation des médicaments……...11

III.1. Définition d'un conservateur…….……..11

III.2. Les parahydroxybenzoates…….……..12

III.3. Les circonstances d'une contamination…….……..13

III.4. La protection vis-à-vis des microorganismes…….……..13

III.5. Choix du système conservateur…….…….……..13

III.6. Mode d'action des parabènes…….……..13

IV. Le contrôle de qualité en industrie pharmaceutique……...14

IV.1. Qualité…….14

IV.2. La qualité d'un médicament……...…….14

IV.3. Contrôle de qualité……...……...…….14

IV.4. Assurance qualité..……...……...…….14

IV.5. Les bonnes pratiques de fabrication (BPF).…….15

IV.6. Autorisation de mise sur le marché (AMM) ……..15

IV.7. Dénominations Communes Internationales (DCI)..……..……..15

Partie II : Matériel et Méthodes

I. Matériel……..16

I.1. Matériel non biologique……..16

I.2. Matériel biologique……..…...16

II. Méthodes…….16

II.1. Echantillonnage et prélèvement……17

II.1.1. Prélèvement des matières premières……..……17

II.2. Contrôle physicochimique des matières premières……..…….……18

II.2.1. Contrôle physicochimique de la Cyproheptadine Chlorhydrate…….....18

II.2.1.1. Identification physicochimique de la Cyproheptadine Chlorhydrate……..…18

II.2.1.2. Contrôle physicochimique de la Cyproheptadine Chlorhydrate ……....20

II.2.1.2. Dosage par potentiometrie ……..23

II.2.2.1. Identification physicochimique du Propyl Parabène…….…….....23

II.2.2.1. Contrôle physicochimique du Propyl Parabène…….…….....26

II.3.1. Identification physicochimique du Méthyle Parabène…….…….....28

II.3.2. Contrôle physicochimique du Méthyle Parabène…….…….....30

III. Mise au point et préparation galénique……..33

III.1. Contrôle physico-chimique des mélanges semi-finis……...35

III.2. Contrôle Microbiologique des mélanges semi-finis……39

III.2.1. Dénombrement des germes aérobies totaux et levures et moisissures totales…….....39

III.2.2. *Esherichia coli*……40

III.3. Contrôle toxicologique (test d'innocuité) des mélanges semi-finis……41

IV. Etude de la stabilité des mélanges semi-finis Heptagyl 0.04 % ®……43

Partie III : Résultats et Discussion

I. Identification et contrôle physico-chimique de la matière première…….45

I.1. Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du principe actif..…..……...45

I.2. Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique des conservateurs antimicrobiens…46

I.2.I. Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du Propyl Parabène…....46

I.2.2. Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du Méthyle Parabène…...48

II. Discussion ……..…….49

III. Résultats du contrôle physicochimique des mélanges semi-fini……..……...51

III.1. Résultats de la densité relative…….51

III.2. Résultats du potentiel d'hydrogène pH……52

III.3. Résultats du dosage en Cyproheptadine Chlorhydrate et en Parabènes……..…52

IV. Contrôle microbiologique des produits semi-finis……..55

V. Contrôle toxicologique des mélanges semi-finis (test d'innocuité)…….56

VI. Résultats de l'étude de stabilité……..57

VI.1. Résultats de l'étude de stabilité dans les conditions réelles…….57

VI.1.1. Résultats de la densité relative……..57

VI.1.2. Résultats du potentiel d'hydrogène pH……...……..58

VI.1.3. Résultats du dosage en Cyproheptadine Chlorhydrate et en Parabènes……...58

VI.1.4. Résultats du contrôle microbiologique……....59

VI.1.5. Résultats du test de toxicologie……59

VI.2. Résultats de l'étude de stabilité dans les conditions accélérées……...60

VI.2.1. Résultats de la densité relative……..60

VI.2.2. Résultats du potentiel d'hydrogène pH……60

VI.2.3. Résultats du dosage en Cyproheptadine Chlorhydrate et en Parabènes…….....61

VI.2.4. Résultats du contrôle microbiologique……62

VI.2.5 Résultats du test de toxicologie……62

Conclusion……65

Références bibliographiques……68

Annexes

Résumé

Notre étude a porté sur la qualité et l'étude de stabilité du médicament générique Heptagyl 0.04 % ® (anti-histaminique), pour cela nous avons effectué un contrôle physicochimique du principe actif (Cyproheptadine Chlorhydrate) et des conservateurs antimicrobiens (Parahydroxybenzoate de Méthyle et Parahydroxybenzoate de Propyl), après avoir vérifier la qualité du principe actif et des conservateurs antimicrobiens on a préparer des mélanges semi-finis d'Hyptagyl 0.04 % ® à différentes concentrations de conservateurs antimicrobiens.

L'analyse par spectrométrie d'absorption en infrarouge a permis l'identification du principe actif et des conservateurs antimicrobiens, les résultats de la teneur en eau et la mesure des cendres sulfurique et le dosage des substances apparentées ont révélés la bonne qualité et la pureté du principe actif et des conservateurs antimicrobiens.

Le contrôle physicochimique des mélanges semi-fini d'Heptagyl 0.04 % ® comprend un contrôle pharmaco-technique qui vise à vérifier certains paramètres (pH, densité) et le dosage par chromatographie liquide à haute performance du principe actif et des conservateurs antimicrobiens permettant de contrôler sa quantité dans le générique. En dernière étape, l'étude de stabilité dans les conditions réelles et les conditions accélérées après un mois de préparation des mélanges semi-finis été effectué pour vérifier la quantité du principe actif et des conservateurs antimicrobiens; les résultats obtenus ont révélé un respect des normes exigées par la Pharmacopée Européenne (2017).

Le contrôle microbiologique des mélanges semi-fini d'Heptagyl 0.04 % ®, a quant à lui consisté à rechercher certains germes pathogènes pouvant être nuisibles à la santé des patients consommant ce médicament. Ce contrôle a conclu à la bonne qualité du produit.

Le contrôle toxicologique des mélanges semi-finis a montré une innocuité et une absence d'agents toxiques.

Enfin, les résultats de l'étude de stabilité *in vitro* ont confirmé la bonne qualité des conservateurs antimicrobiens utilisés dans Heptagyl 0.04 %

Les mots clés : Qualité, Stabilité, Heptagyl 0.04 % ®, Parahydroxybenzoate de Méthyle, Parahydroxybenzoate de Propyl, Conditions réelles, Conditions accélérées.

Abstract

Our study reviews the quality and pharmaceutical stability of the generic drug Heptagyl 0.04 % ® (anti-histaminic). Therefore, we have performed a physicochemical control test on the active ingredient (Cyproheptadine Chlorhydrate) and its antimicrobial preservatives (Parahydroxybenzoate Methyl and Parahydroxybenzoate Propyl), after confirming the quality of the active ingredient and the antimicrobial preservatives, we have prepared semi-finished mixtures of Heptagyl 0.04 % ® with different concentrations of antimicrobial preservatives.

Analysis by infrared absorption spectrometry allowed the identification of active ingredient and the antimicrobioal preservatives. The results water content and measurement of sulfuric ashes and determination of related substances revealed the good quality and purity of active ingredient and antimicrobial preservatives.

The physicochemical semi-finished mixtures of Heptagyl 0.04 % includes a pharmacothechnical technology which aims to verify certain parameters (pH, Density) and a dosing procedure by high performance liquid chromatography of the active ingredient and antimicrobial preservatives to control its amount in the generic product. Finally the study of stability in real conditions and accelerated conditions tests after one month of preparation of semi-finished mixtures was performed to check the dose of active ingredient and antimicrobial preservatives; the results revealed a compliance with the standards required by the European Pharmacopoeia (2017).

The microbiological control of semi-finished mixtures of Heptagyl 0.04 % ® helped searching for certain pathogens that can be harmful to the health of patients consuming the drug. This control shows a good quality of the product. The control of the semi-finished mixtures toxicity showed harmlessness and lack of toxic agents.

Finally, the results of the the study of the stability *in vitro* confirms the quality of antimicrobial preservatives used in Heptagyl 0.04 %.

Keywords: Quality, Cyproheptadine Chlorhydrate, Parahydroxybenzoate Methyl, parahydroxybenzoate Propyl, Stability, Heptagyl 0.04 % ®, Real conditions, Accelerated conditions.

ملخص

تستعرض دراستنا جودة واستقرار المواد الحافظة للدواء الجنيس هيبتاجيل 0.04 % ® ، لتحقيق ذلك كان علينا القيام أولا باختبار فيزيوكيميائى على المكون الفعال (سيبروهيبتادين كلورهيدرات) وعلى المواد الحافظة (باراهيدروكسي بنزوات الميثيل و باراهيدروكسي بنزوات البروبيل). و بعد التأكد من نوعية المادة الفعالة و المواد الحافظة قمنا بتحضير المنتج الشبه نهائي لشراب هيبتاجيل 0.04 % ® الذي أردنا فيه تغيير نسبة تركيز المواد الحافظة في كل مرة.

جهاز امتصاص الأطياف ما تحت الحمراء ساعد على التعرف على المكون الفعال و المواد الحافظة. اختبار محتوى الماء و كمية الرماد الكبريتي المقاسة و قياس كمية المواد اللانقية في المنتج بينت جودة ونقاوة المكون الفعال و المواد الأولية.

الفحص الفيزيوكيميائي للمنتجات الشبه النهائيّ لشراب هيبتاجيل 0.04 % ® يشمل الفحص الصيدلاني التقني الذي يهدف إلى التحقق من بعض الضوابط (درجة الحموضة و الكثافة)، وأيضاً إلى تحديد عن طريق التفرقة اللونية السائلة عالية الأداء، كمية المادة الفعالة و المواد الحافظة في الدواء الجنيس. و أخيرا، اختبار استقرار المنتجات الشبه النهائية في الشروط الحقيقية و الشروط المتسارعة بعد شهر من تحضير المنتجات الشبه النهائية و الذي يهدف إلى التحقق من كمية المادة الفعالة و المواد الحافظة، النتائج كشفت احترام للمعايير المفروضة من قبل دستور الأدوية الأوروبية (2017).

الفحص الميكروبيولوجي للمنتجات الشبه النهائيّ لشراب هيبتاجيل 0.04 % ®، في الشروط الحقيقية و المتسارعة سمح بالبحث عن بعض الجراثيم الممرضة التي قد تعرض مستهلكيه إلى أضرار صحية. هذا الفحص يظهر نوعية جيدة لهذا المنتج.

فيما يخص فحص التأثرات السمية للمنتجات الشبه النهائيّ فإنه يظهر سلامة و غياب لعوامل سامة.

أخيرا، نتائج دراسة استقرار المنتجات الشبه النهائية في المخبر أثبتت النوعية الجيدة للمواد الحافظة و المستعملة في شراب هيبتاجيل 0.04 % ®.

الكلمات الدالة: الجودة، إستقرار، الشروط الحقيقية، الشروط المتسارعة، سيبروهيبتادين كلورهيدرات، هيبتاجيل 0.04 % ®، باراهيدروكسي بنزوات الميثيل، باراهيدروكسي بنزوات البروبيل.

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

DCI : Dénomination Commune Internationale

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Parabènes : Parahydroxybenzoates

USP : Pharmacopée Américaine

PE : Pharmacopée Européenne

UFC : Unités Formant des Colonies

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence d'asthme allergique en Algérie (Nafti et al. 2009)……...…….3

Figure 2 : Mécanisme général de la réaction allergique (Owen et al. 2013)…….4

Figure 3 : Médicament original et médicament générique (ANSM, 2012)……..….7

Figure 4 : Chlorhydrate de Cyproheptadine (Pharmacopée Européenne, 2007)……..….9

Figure 5 : Structure du Propyl Parabène (a) et Méthyle Parabène (b) (Harvey et al. 2004)……...……..12

Figure 6 : Souris *Mus Musculus* avant administration per os des mélanges ……...42

Figure 7 : Spectre référence d'absorption par infrarouge de la Cyproheptadine Chlorhydrate……..50

Figure 8 : Spectre d'absorption par infrarouge de l'échantillon Cyproheptadine Chlorhydrate……..……50

Figure 9 : Exemple de répétabilité des injections d'HPLC dans un échantillon....……..……...54

Liste des tableaux

Tableau 01 : Informations concernant les trois échantillons étudiés……..……..17

Tableau 02 : La pesée de matière première en fonction de la nature de solubilité …….....18

Tableau 03 : Changement de la phase mobile A et B avec le temps.……..……21

Tableau 04 : Les limites de substances apparentées ……...……...……23

Tableau 05 : Composition des mélanges semi fini en principe actif et parabènes…….....33

Tableau 06 : Composition du sirop Heptagyl 0.04 % ® dans une quantité de 100 ml ……...33

Tableau 07 : Pesées des mélanges semi fini pour une quantité de 200 ml …….……34

Tableau 08 : Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du principe actif.……45

Tableau 09 : Résultats de l'identification et du contrôle physicochimque du propyl parabène ……...46

Tableau 10 : Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du Méthyle Parabène ……..…….48

Tableau 11 : Résultats de la densité relative des mélanges semi-finis ……...…52

Tableau 12 : Résultats des mesures de pH des mélanges semi-finis ……...……...52

Tableau 13 : Résultats du dosage du principe actif et des parabènes dans les mélanges semi-finis……...……..……...53

Tableau 14 : Résultats du contrôle microbiologique des mélanges semi-finis ……...55

Tableau 15 : Résultats du test d'innocuité d'Heptagyl 0.04 % ® chez les souris …….56

Tableau 16 : Résultats de la densité relative des mélanges semi-finis dans le réel ……57

Tableau 17 : Résultats des mesures de pH des mélanges semi-finis dans le réel ….……...58

Tableau 18 : Résultats du dosage du principe actif et des parabènes dans les mélanges semi-finis dans le réel……58

Tableau 19 : Résultats des mesures de pH des mélanges semi-finis dans le réel …..……..59

Tableau 20 : Résultats du test d'innocuité d'Heptagyl 0.04 % ® chez les souris dans le réel ……...59

Tableau 21 : Résultats de la densité relative des mélanges semi-finis dans l'accéléré …..……..60

Tableau 22 : Résultats des mesures de pH des mélanges semi-finis dans l'accéléré…..…...60

Tableau 23 : Résultats du dosage du principe actif et des parabènes dans les mélanges semi-finis dans l'accéléré ….……61

Tableau 24 : Résultats du contrôle microbiologique des mélanges semi-finis dans l'accéléré……...……...62

Tableau 25 : Résultats du test d'innocuité d'Heptagyl 0.04 % ® chez les souris dans l'accéléré…..……....62

Introduction

Introduction :

Les maladies allergiques ne sont pas nouvelles. Elles ont été décrites à travers la littérature médicale ancienne dans diverses cultures comme celles de l'Egypte, la Chine, l'Amérique indigène et dans la tradition gréco-romaine (Bergmann et al. 2014).

L'allergie est une réaction anormale ou une sensibilité accrue à certaines substances. L'individu allergique produit des symptômes lorsqu'il est exposé à ces substances, qui sont pourtant inoffensives pour les personnes non allergiques. La raison principale en est que les personnes allergiques fabriquent un type spécial d'anticorps appelé immunoglobuline E (IgE), qui peut interagir avec des substances environnementales de manière dangereuse (Chhajer, 2016).

En cas d'allergie, l'histamine libérée par les mastocytes, les basophiles et d'autres cellules se lie aux récepteurs H1 spécifiques du nez, des yeux, des voies respiratoires et de la peau, provoquant des symptômes caractéristiques d'œdème, de démangeaisons, de rhinorrhée et de larmoiement (Caughey, 2004).

Les Antihistaminiques H_1 ne modifient pas directement les effets de l'histamine en empêchant la libération d'histamine, mais suppriment les effets induits par l'histamine en bloquant l'accès de l'histamine aux sites récepteurs H_1 (Caughey, 2004).

Dans le but de garantir l'effet thérapeutique des antihistaminiques et autres médicaments, l'industrie pharmaceutique utilise différents excipients comme les parabènes qui sont utilisés comme des agents antimicrobiens, antifongiques et antioxydants (Tay et al. 2010).

Dans notre étude nous nous sommes intéressés en une mise au point galénique d'un sirop antihistaminique Heptagyl 0.04 % ® à différentes concentrations de conservateurs antimicrobiens les parahydroxybenzoates de Méthyle et de Propyl. Le principe actif et les parabènes ont subit un contrôle physicochimique, alors que les préparations semi-finis en plus du contrôle physicochimique, un contrôle microbiologique et toxicologique a été réalisé.

Nous avons étudié la stabilité des mélanges après 1 mois de préparation dans des conditions réelles et accélérées. Le but était de savoir si les conservateurs antimicrobiens se

dégradent avec le temps et si le sirop garde toujours ses mêmes qualités chimique, microbiologique et toxicologique et n'entraine aucun risque pour la santé du consommateur.

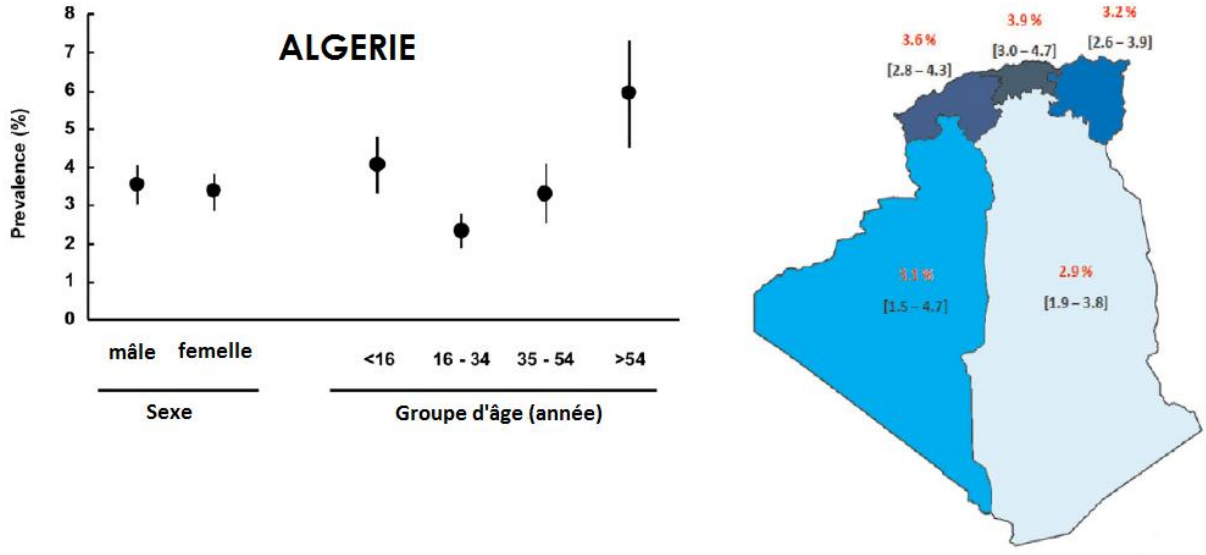
Partie Bibliographique

I. Les allergies :

Pour l'OMS, l'allergie est la sixième grande pathologie dans le monde et elle est en nette recrudescence dans la plupart des pays, particulièrement en Occident ; on parle d'une progression spectaculaire, d'une inquiétante montée des allergies. Certaines d'entre elles menacent la vie du sujet, tel le choc anaphylactique, d'autres sont des affections bénignes(le rhume des foins, l'urticaire), mais elles constituent pour le patient un handicap souvent important et elles ont un impact socio-économique tel qu'elles posent un véritable problème de santé publique. Les plus fréquentes sont les manifestations respiratoires et les manifestations cutanées (Molina, 1997).

Une étude menée par Nafti et al. (2009) sur l'asthme, qui est lié à des allergies dans 85% des cas, avait montré que la prévalence de l'asthme dans les pays du Maghreb était modérée mais son impact est élevé. En Algérie, la prévalence de l'asthme ajustée en fonction de l'âge et du sexe était de 3,45%, elle était la plus élevée chez les enfants et les adultes plus âgés, et dans les zones urbaines (Figure 1).

Figure 1 : Prévalence d'asthme allergique en Algérie (Nafti et al. 2009)



I.1. Définition de l'allergie :

L'allergie est une réaction anormale et outrancière qui traduit une hypersensibilité du système immunitaire lorsque l'organisme se trouve au contact de substances ou de corps étranger, les allergènes. Ces dernières peuvent être de natures et d'origines diverses : acariens, pollens, moisissures etc. L'organisme serait d'ailleurs encore plus réactif s'il n'a pas été au contact d'agents pathogènes dès la petite enfance (Guedj, 2010).

I.2. Mécanisme d'allergie :

L'allergie n'est pas une maladie ! C'est un mécanisme responsable de diverses pathologies comme l'asthme, le rhume des foins, le choc anaphylactique. Ce mécanisme (Figure 2) est immunologique, c'est-à-dire qu'il met en jeu des cellules et des anticorps. Les cellules font partie des globules blancs, ce sont des lymphocytes. Les anticorps font partie de la classe d'immunoglobulines E, en abrégé IgE. Un faible nombre circule dans le sang. La plupart des IgE sont fixés sur des cellules grâce à un récepteur. Chez les sujets allergiques, ces cellules disséminées dans l'organisme, peau, tube digestif, voies respiratoires, ont leur surface hérissée de ces immunoglobulines, comme une pelote d'épingles. Les cellules ont pour noms : éosinophiles, basophiles, mastocytes. Ce sont les effectrices majeures de la réponse allergique (Robert, 2012).

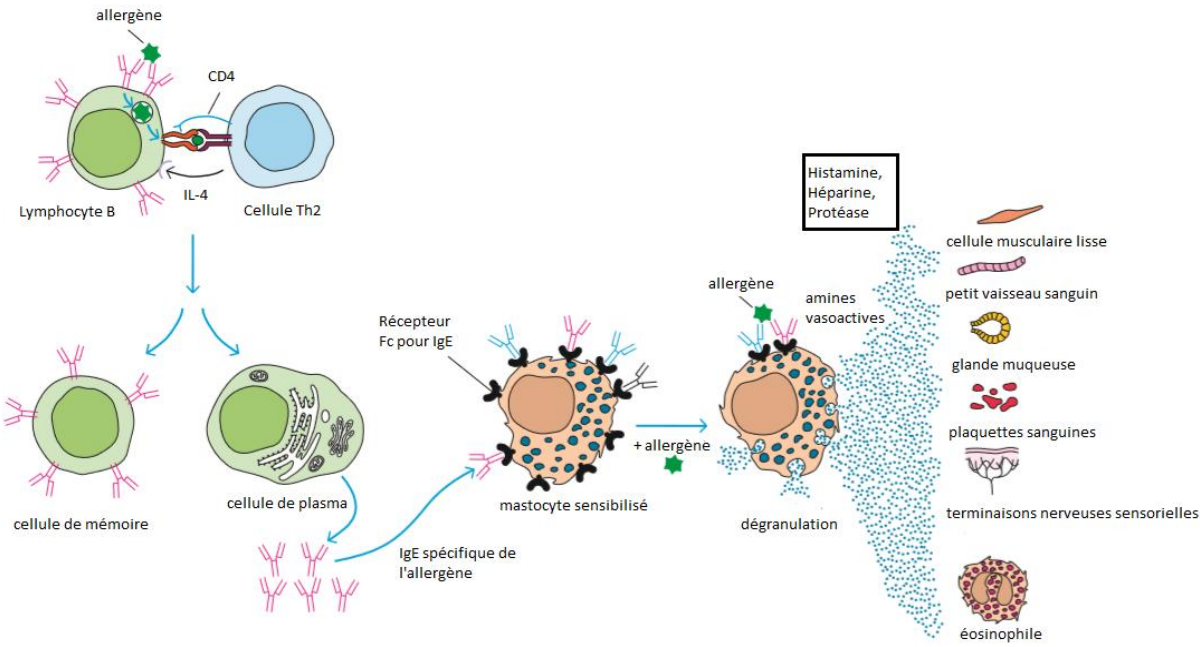


Figure 2 : Mécanisme général de la réaction allergique (Owen et al. 2013)

Lors d'un contact entre un allergène et la zone de reconnaissance de l'IgE, la cellule effectrice alertée, stimulée, va relâcher un ensemble de molécules responsables des signes cliniques. Ces signes ressemblent fort à ceux de l'inflammation : rougeur, œdème, prurit, obstruction respiratoire (Robert, 2012).

I.3. Définition de l'histamine :

L'histamine est une amine biogène découverte par Dale en 1910. Elle est responsable de plusieurs réactions vasculaires et glandulaires inhibées par les antihistaminiques classés en deux groupes anti-H1 et anti-H2 (Cohen et al. 2008).

Les tissus qui sont très riches en histamine sont la peau, le poumon, la muqueuse gastrique et le foie. Elle agit sur deux types de récepteurs (Bustany et al. 1993) :

H1 : essentiellement responsable des effets sur les fibres musculaires lisses vasculaires et extravasculaires et de la stimulation des récepteurs nociceptifs cutanés.

H2 : intervenant au niveau de la sécrétion des glandes exocrines (il existe vraisemblablement des récepteurs H2 vasculaires) ; la 4-méthyl-histamine est un agoniste des récepteurs H2, alors que le métiamide et la cimétidine sont des antagonistes.

I.4. Les antihistaminiques :

C'est en 1910 que Dale et Laidlaw ont découvert le rôle fondamental de l'histamine dans le phénomène d'anaphylaxie. On a ensuite rapidement compris que ce médiateur pouvait aussi provoquer, de façon moins spectaculaire, de l'urticaire, des démangeaisons cutanées et oculaires, du larmoiement, de l'écoulement nasal, des éternuements et de la toux. Très vite, des médicaments capables de bloquer l'histamine « antihistaminiques » ont été mis au point, mais il a fallu attendre le milieu des années 1940 pour disposer de versions non toxiques de cette nouvelle classe médicamenteuse (Michel, 2017).

Les antihistaminiques sont particulièrement utiles pour limiter les symptômes de la rhinite et de la conjonctivite allergique ainsi que le prurit cutané et l'urticaire, mais malheureusement, ils ne sont pas actifs dans l'asthme, parce que l'histamine ne joue qu'un rôle très accessoire dans cette maladie. Les antihistaminiques doivent donc avoir recours à d'autres stratégies antiallergiques (Michel, 2017).

Les antihistaminiques H1 et H2 :

Les antihistaminiques sont des médicaments capables de s'opposer aux effets de l'histamine. On distingue les antihistaminiques H1, les premiers connus, qui antagonisent les effets vasculaires et bronchiques de l'histamine et les antihistaminiques H2, qui inhibent l'action de l'histamine sur la sécrétion chlorhydrique du suc gastrique (Cohen et al. 2008) :

- **Antihistaminiques H1**

Les premiers antihistaminiques ont été synthétisés par Fourneau (929 F ou thymoxyethyldiethylamine) et étudiés par Staub a l'institut Pasteur de
Paris en 1937. Ultérieurement ont été proposées la phenbenzamine, ou *Antergan*, première molécule utilisée en therapeutique, puis la mepyramine, ou *Néo-Antergan*, longtemps considérée comme l'antihistaminique type en pharmacodynamie expérimentale.

- **Antihistaminiques H2**

Les antihistaminiques H2 s'opposent aux effets stimulants de l'histamine sur la sécrétion gastrique, sur le rythme et la fréquence cardiaque, sur le relâchement de l'utérus de ratte.

II. Définition d'un médicament :

Un médicament est une substance possédant des propriétés curatives ou préventives destinées à guérir, soulager ou prévenir les maladies. Il contient à la fois la notion de guérison et de prévention. Médicament vient du mot latin *medicamentum*, fait de *medicare* (donner des remèdes). Depuis les temps les plus reculés, l'homme a cherché dans la nature non seulement sa nourriture, mais également des remèdes pour soulager ou guérir ses maux, et a appris à discerner les poisons. Jusqu'à une période récente, les médicaments ont été uniquement naturels, tirés de trois règnes (minéral, végétal et animal), et les drogues étaient utilisées en nature et sous forme d'extraits complexes (Vandamme et al. 2010).

II.1. Définition du générique :

Le générique est un médicament ayant la même composition qualitative et quantitative en principes actifs qu'une spécialité de référence. C'est une copie conforme en qualité et en quantité de la spécialité d'origine, mais avec un coût commercial inférieur correspondant à l'absence d'investissement de recherche. Les génériques sont destinés à se substituer au médicament original (Stora, 2005).

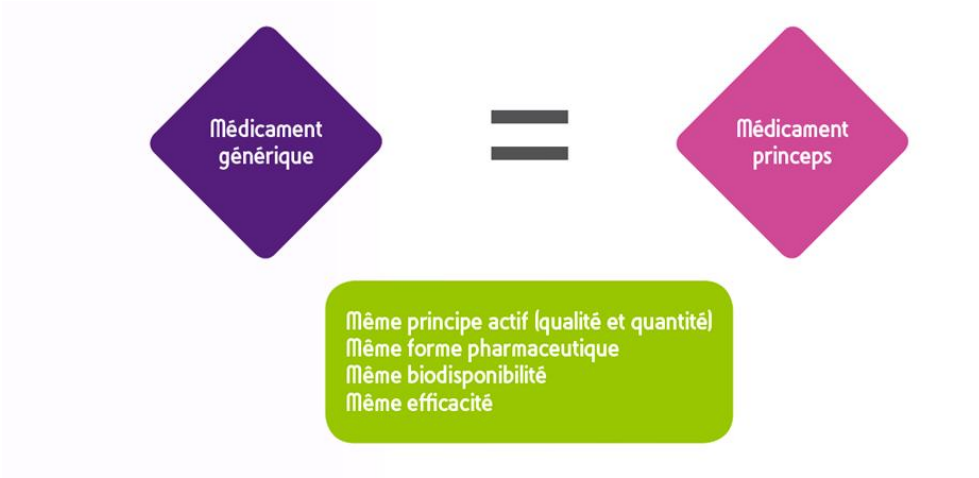


Figure 3 : Médicament original et médicament générique (ANSM, 2012)

II.2. Définition d'un principe actif :

Le principe actif est la substance active douée de propriété pharmacologique et à la base de l'effet thérapeutique du médicament (Talbert et al. 2009)

II.3. Définition d'un excipient :

Les excipients (ou adjuvants, ou véhicules) sont des composants sans action pharmacologique mais nécessaires à la fabrication, à l'administration ou à la conservation du médicament (Talbert et al. 2009).

Les excipients utilisés en pharmacie sont extrêmement nombreux, ce qui s'explique, d'une part, par la diversité des caractéristiques physiques et chimiques des principes actifs, dont ils doivent être les auxiliaires, et d'autre part, par la variété des rôles qu'ils ont à jouer.

Ceux-ci sont de trois sortes. Il leur est demandé (Le Hir et al. 2011) :

- de faciliter l'administration des principes actifs : c'est le cas des solvants des solutions injectables et buvables et des excipients pour pommades, suppositoires, etc., mais aussi des aromatisants, édulcorants, colorants qui font mieux accepter le médicament par le malade ;
- d'améliorer l'efficacité du principe actif : c'est le cas d'un excipient pour pommade qui facilite la pénétration d'un principe actif ou de celui d'une forme à libération prolongée qui augmente la durée d'activité ;
- d'assurer la stabilité et par conséquent la conservation jusqu'à la limite d'utilisation fixée ; c'est le cas des conservateurs : antiseptiques, antifongiques, antioxygènes, chélatants, etc. et aussi des acides, bases et tampons qui permettent l'ajustement du pH.

II.4. Pharmacie galénique :

La pharmacie galénique est une discipline fondamentale dans le développement d'un médicament car elle y-est impliquée dès sa conception jusqu'aux études cliniques en passant par la transposition industrielle (Gazengel et al. 2013).

Lors de sa conception, il faudra choisir une formulation adaptée aux objectifs thérapeutiques en fonction des propriétés physico-chimiques de la substance active, de sa stabilité et aussi de la voie d'administration retenue (Gazengel et al. 2013).

II.5. Les sirops :

Les sirops sont des préparations aqueuses de saveur sucrée et de consistance visqueuse (concentration minimum de saccharose = 45 % m/m). Le saccharose assure une certaine protection antimicrobienne et souvent une bonne conservation du produit avant ouverture (Gazengel et al. 2013).

II.6. Le sirop Heptagyl 0.04 % ® :

Le sirop Heptagyl 0.04 % ® est un médicament générique et qui a comme principe actif la cyprohéptadine, il est commercialisé par le groupe industriel SAIDAL, il se présente sous forme de sirop et il est préconisé dans le traitement des manifestations allergiques aigues ou chroniques, rhinites et conjonctivites allergiques, épisodes allergiques de la peau avec

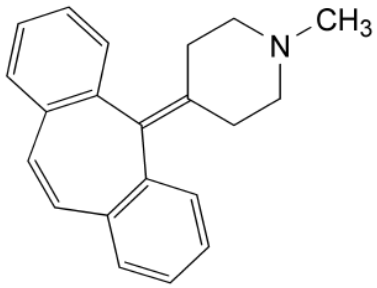
démangeaisons et traitement de l'inappétence avec amaigrissement. Il contient plusieurs excipients qui sont : le parahydroxybenzoate de methyle, parhydroxybenzoate de propyle, l'acide citrique, sucre et éthanol 96 % (Documents Saidal, 2017).

II.6.1. La Cyproheptadine :

La cyproheptadine est un dérivé du dibenzocycloheptene comme la protriptyline, antidepresseur. Comme cette dernière, elle est anticholinergique et, de plus, antihistaminique H1, antiserotonine 5 HT2 et sedative. Elle est utilisée dans les manifestations allergiques aux doses orales de 4 a 20 mg/j. On a constate un effet orexiant (augmentation de la prise de nourriture), probablement par son action centrale antiserotonine; la stimulation de l'appétit est obtenue à la dose quotidienne orale de 12 mg chez l'adulte et proportionnellement inferieure chez l'enfant. Le surdosage chez l'enfant conduit a un état d'excitation. (Cohen et al. 2008).

II.6.2. Structure du Chlorhydrate de Cyproheptadine :

Le chlorhydrate de cyproheptadine contient au minimum 98,5 pour cent et au maximum l'équivalent de 101,0 pour cent de chlorhydrate de 4-(5*H*-dibenzo[*a*,*d*]cycloheptén-5-ylidène)-1-méthylpipéridine, calculé par rapport à la substance anhydre (Pharmacopée Européenne, 2007)



, HCl , $1^1/_2$ H_2O

$C_{21}H_{22}ClN,1^1/_2H_2O$

Figure 4 : Chlorhydrate de Cyproheptadine (Pharmacopée Européenne, 2007)

II.6.3. Pharmacodynamie de la Cyproheptadine :

La pharmacodynamie est l'étude du mode d'action des médicaments dans l'organisme, ainsi que l'effet pharmacologique qu'il engendre. Le médicament possède des effets pharmacologiques qu'il peut exprimer grâce à un mécanisme d'action. Il va agir sur les cellules de l'organe ciblé. Il va exercer son action par différentes mécanismes :

- action au niveau des récepteurs cellulaires ;
- action sur une enzyme intracellulaire ;
- action sur un phénomène de transport transmembranaire ;
- action sur les synthèses protéiques (protéines) ou nucléiques (ADN et ARN) (Stora, 2013)

La Cyproheptadine est un antihistaminique H1, qui se caractérise par (Vidal, 2012) :

- un effet sédatif marqué aux doses usuelles, lié à une activité antihistaminique, anticholinergique et adrénolytique centrale ;
- un effet anticholinergique, pouvant être par ailleurs à l'origine d'effets indésirables ;
- un effet adrénolytique, pouvant aussi retentir au plan hémodynamique (risque d'hypotension orthostatique).

Les antihistaminiques ont en commun la propriété de s'opposer, par antagonisme compétitif plus ou moins réversible, aux effets de l'histamine, notamment sur la peau, les vaisseaux et les muqueuses conjonctivales, nasales, bronchiques et intestinales (Vidal, 2012).

II.6.4. Pharmacocinétique de la Cyproheptadine :

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme. La détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter la posologie pour son utilisation future (Lecaht, 2006)

Le temps pour atteindre une concentration plasmatique maximale en cyproheptadine après administration par voie orale est de 6 à 9 heures. La demi-vie d'élimination est comprise entre 10 et 15 heures. Le métabolisme consiste en une déméthylation suivie d'une oxydation

et d'une hydroxylation, puis d'une sulfoconjugaison. L'élimination par voie rénale représente 2/3 à 3/4 de la clairance totale. Environ 5 % de la quantité de cyproheptadine administrée est retrouvée sous forme inchangée dans les urines. L'élimination étant diminuée chez les insuffisants rénaux, il existe un risque de surdosage chez ces patients dont il est important de tenir en compte (Vidal, 2012).

III. La conservation des médicaments :

Les médicaments les plus altérables sont ceux en phase liquide aqueuse et ceux présentés en multidoses. L'efficacité des antimicrobiens dépend donc aussi du type de conditionnement et du mode de fermeture. La Pharmacopée Européenne préconise des tests d'efficacité et oblige à mentionner les conditions de conservation sur l'emballage. Ce sont surtout des substances acides car un pH bas empêche le développement des micro-organismes (Allo et al. 2005).

III.1. Définition d'un conservateur :

Un agent conservateur est une substance ou un produit chimique naturel ou synthétique que l'on ajoute aux produits tels que les aliments, les produits pharmaceutiques, les peintures, les échantillons biologiques, les bois, les produits cosmétiques, etc., afin d'en prévenir la décomposition due à une prolifération microbienne ou à des changements chimiques indésirables. La conservation de ces produits est un besoin ancien : les égyptiens utilisaient du sulfate de cuivre, un conservateur bien connu, dans leurs formulations d'ombre à paupières. Les microorganismes spécifiques dont il est particulièrement nécessaire de se protéger incluent *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* et *Staphylococcus aureus*. Nous avons besoin des agents conservateurs pour éviter la contamination, en particulier dans les produits naturels. Les conservateurs sont en outre indispensables chaque fois qu'un produit pour application locale contient de l'eau.

Les huiles et lipides purs nécessitent des antioxydants pour empêcher la rancidité, mais moins de conservateurs. Le conservateur idéal doit être incolore, inodore, hydrosoluble, non toxique, non allergène, non irritant, efficace sur un large éventail de pH et capable d'inhiber la prolifération d'un large spectre de bactéries et de champignons. A l'heure actuelle, aucun conservateur ne répond à l'ensemble de ces exigences. Il existe de nombreux conservateurs naturels tels que le sel, le vinaigre, le sucre, les huiles essentielles et les plantes,

mais la plupart des agents conservateurs sont synthétiques. Les conservateurs synthétiques de prédilection utilisés dans les produits tels que les produits destinés aux soins de la peau sont : les parabènes (méthyl-, éthyl-, propyl-, butylparabène), les dérivés de l'urée (imidazolidinyl urée, diazolidinyl urée) les isothiazolinones (méthylchloro, méthylisothiazolinone), les composés organohalogénés (iodopropynyl butylcarbamate, méthyldibromo glutaronitrile), les acides organiques et d'autres encore (benzoate de sodium, chloracétamide, EDTA, phénoxyéthanol, Triclosan, DMDM hydantoine, Quaternium 15). Les conservateurs peuvent être toxiques et cancérigènes. La plupart ont un effet sur le système nerveux, en modifiant le comportement. Certains ont une influence sur la santé de la reproduction ou affaiblissent le système immunitaire (Le Coz, 2010).

III.2. Les parahydroxybenzoates :

La famille des parabènes regroupe de nombreuses substances. Les plus utilisés sont le méthylparabène (MP), l'éthylparabène (EP), le porpylparabène (PP) et le butylparabène (BP). Grace à leurs propriétés bactéricides et fongicides, les parabènes sont des conservateurs et ils sont susceptibles d'entrer dans la composition d'une majorité de produit d'hygiène et de beauté tel que savons, gels douches, mousses à raser, shampoings, déodorants, dentifrices, bains de bouche, crèmes pour le visage et pour le corps et produits de maquillage. Ils peuvent également être présents dans les médicaments et dans les aliments (confitures, pâtisseries, conserves). Par exemple, les additifs E214, E216 et E 218 désignent respectivement l'éthyl, le propyl et le méthylparabène (Caro et al. 2017).

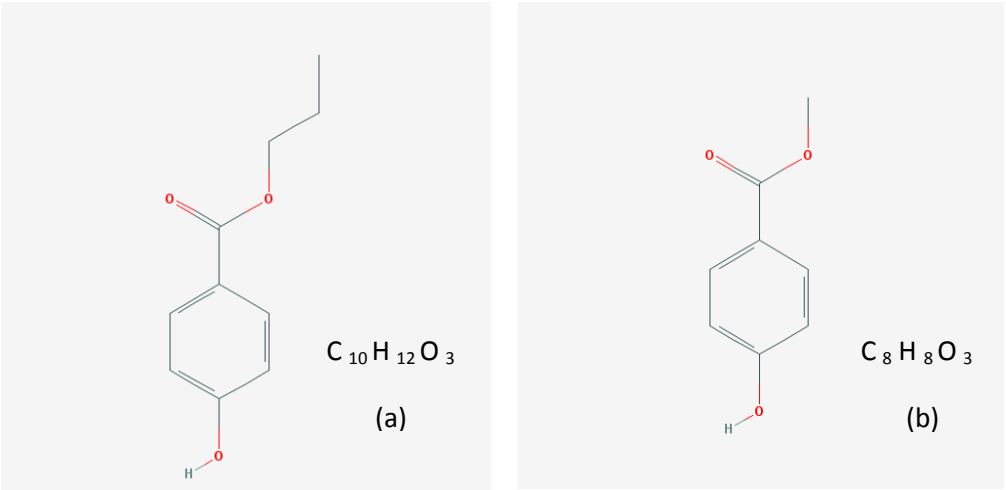


Figure 5 : Structure du Propyl Parabène (a) et Méthyle Parabène (b) (Harvey et al. 2004)

III.3. Les circonstances d'une contamination :

Dans un produit contaminé, le micro-organisme utilise celui-ci comme nourriture pour en tirer de l'énergie. En échange, il diffuse dans le milieu des déchets provenant de cette transformation. Dans la contamination microbienne des produits il faut distinguer la contamination primaire qui peut survenir lors de la fabrication (matières premières, locaux, matériel, personnel) de la contamination secondaire (concerne le consommateur), qui, elle, survient après (Martini et al. 1999).

III.4. La protection vis-à-vis des micro-organismes :

La contamination microbiologique peut être préjudiciable pour la santé du consommateur, et dans une autre mesure pour le fabriquant. La protection vis-à-vis des microorganismes peut être réalisée par stérilisation dans le cas des produits injectables, ou plus communément par addition d'agents antimicrobiens. Ces substances permettent d'éviter la prolifération microbienne qui peut constituer un risque infectieux pour le malade ou le consommateur et accélérer la détérioration du produit (Bonnes Pratiques de Fabrication, 2014).

III.5. Choix du système conservateur :

L'efficacité d'un conservateur dans un produit quel qu'il soit (cosmétique, médicament, aliment) va dépendre du pH du milieu, de sa dose d'emploi, de son coefficient de répartition, des micro-organismes présents, de la présence de particules solides, de la température, de la présence d'huile naturelle, du conditionnement (Knowlton et al. 1993).

III.6. Mode d'action des parabènes :

Malgré le fait qu'on les utilise depuis plus de 50 ans, le mécanisme d'action des parabènes n'est toujours pas complètement élucidé (Mulburry et al. 1987).

Les parabènes sont actifs vis-à-vis d'un grand nombre de micro-organismes. Ils interagissent avec les voies métaboliques clés, l'efficacité étant plus importante vis-à-vis des

levures et des moisissures que vis-à-vis des bactéries. Les bactéries à Gram + sont cependant plus sensibles aux parabens que celles à Gram - (Soni et al. 2005).

Les parabènes agissent sur les deux phases, germinative ou végétative, du développement des micro-organismes. La phase de germination est beaucoup plus sensible aux parabènes que la croissance végétative des champignons ou bactéries (Soni et al. 2005).

Les parabènes présentent de multiples actions biologiques, mais il est généralement admis que leurs effets sur le transport à travers la membrane cellulaire et la paroi cellulosique, et sur le fonctionnement des mitochondries, constituent la clé de leur action (Soni et al. 2005).

IV. Le contrôle de qualité en industrie pharmaceutique :

IV.1. Qualité :

Ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confère l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites (Depecker, 2002).

IV.2. La qualité d'un médicament :

Il s'agit de la qualité à réaliser pour répondre aux besoins des malades, c'est-à-dire à la qualité décrite dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) .Cette description sert de référence pour la fabrication car elle a été établie en fonction des données scientifiques de l'étude des paramètres de la qualité pouvant intervenir dans l'efficacité, l'innocuité et la stabilité du médicament (Le Hir et al. 2011).

IV.3. Contrôle de qualité :

Le contrôle consiste à mesurer une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies. Pour les produits, il s'agit souvent de la vérification de la conformité à des exigences figurant dans le dossier d'AMM ou à la pharmacopée, la vérification étant généralement suivie d'un tri entre entités conformes et non conformes (Le Hir et al. 2011).

IV.4. Assurance qualité :

Selon la norme ISO 8402, l'assurance qualité consiste en « l'ensemble des actions préétablies et systématiques visant à donner à des acteurs la confiance appropriée, en ce

qu'une entreprise fournisse des produits ou des services ayant la capacité de satisfaire, de façon régulière, aux exigences des données relatives à la qualité ». L'assurance qualité est basée sur le principe selon lequel « on respecte mieux les normes en intégrant la qualité au produit en cours de fabrication plutôt qu'en s'efforçant de déceler les éventuelles défaillances au moyen d'une inspection pratiquée en fin de fabrication » (Chiaradia-Bousquet, 1994).

IV. 5. Les bonnes pratiques de fabrication (BPF) :

Normes applicables aux fabricants de produits pharmaceutiques, établies par l'OMS et de nombreux gouvernements ; elles comprennent des critères relatifs au personnel, aux locaux, à l'équipement, au matériel, aux opérations de fabrication, à l'étiquetage, au conditionnement, au contrôle de la qualité et, dans la plupart des cas, aux tests de stabilité (Holloway et al. 2005).

IV. 6. Autorisation de mise sur le marché (AMM) :

Lorsque le laboratoire pharmaceutique qui a développé un nouveau produit estime avoir recueilli suffisamment d'arguments en faveur de sa commercialisation, il dépose à l'Agence du Médicament un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché ou AMM. Ce dossier comprend l'ensemble des résultats des investigations entreprises. Il existe dans chaque pays et à l'échelle européenne un organisme habilité à autoriser la mise sur le marché des médicaments. L'organisme de ce type le plus connu est la FDA (Food and Drug Administration) aux USA. L'organisme habilité peut refuser ou accepter cette autorisation de mise sur le marché. En cas d'acceptation, la molécule active qui, en plus de sa dénomination chimique généralement trop complexe pour être retenue, a une dénomination commune internationale ou DCI, reçoit une dénomination commerciale sous laquelle elle sera vendue en pharmacie (Allain, 2000).

IV.7. Dénominations Communes Internationales (DCI) :

L'Organisation Mondiale de la Santé a mis en place un programme de nomenclature en I950 : la dénomination commune internationale (DCI) ou INN (international non-proprietary name); la DCI permet d'identifier la substance active dans les médicaments. Il s'agit d'un nom scientifique qui permet de désigner une molécule. Les DCI ne doivent pas prêter à confusion avec d'autres noms (Vandamme et al. 2010).

Matériel & Méthodes

Partie II : Matériel et Méthodes

La présente étude a été réalisée au niveau des laboratoires du Site de Production SAIDAL MEDEA durant la période comprise entre le mois de Mai et le mois de Juin 2018. Elle a consisté en une mise au point galénique d'un antihistaminique H1 Heptagyl 0.04 % ® à différentes concentrations de conservateurs antimicrobiens : Méthyle Parabène et le Propyl Parabène, et aux contrôles physicochimique et microbiologique de la matière première ainsi que des préparations semi-finis.

I. Matériel :

I.1. Matériel non biologique :

Pour pouvoir préparer le sirop antihistaminique : Heptagyl 0.04 % ® ainsi que la réalisation de son étude à savoir les contrôles réalisés sur ce produit, on a eu besoin de matières premières à savoir ; un principe actif : la Cyproheptadine Chlorhydrate, des excipients : Méthyle Parabène et Propyl Parabène, Saccharose, Acide Citrique, Ethanol et arome de Cerise et enfin d'un ensemble de matériel non biologique constitué de réactifs, de solution et d'appareillage est nécessaire « Annexe 01 ».

I.2. Matériel biologique :

Pour le test d'innocuité on a utilisé pour chaque préparation galénique 5 souris appartenant à l'espèce *Mus Musculus* de sexe mâle ayant un poids variant de 18 à 22 g. Les souris sont âgées de 2 mois, et prélevées de l'animalerie du Site de Production SAIDAL de Médéa.

II. Méthodes :

Les normes suivies pour le contrôle du principe actif Cyproheptadine Chlorhydrate sont les normes de la Pharmacopée Américaine USP 40, quant aux normes observées pour le contrôle Physicochimique des conservateurs antimicrobiens ainsi que le produit semi sont celles établies par la Pharmacopée Européenne (2017). Pour le contrôle microbiologique les normes adaptées sont celles de la Pharmacopée Européenne (2014) et pour les tests d'innocuité les normes suivies sont celles de la Pharmacopée Européenne (2009).

La Pharmacopée Européenne et Américaine sont des recueils de normes communes, à l'échelle européenne et américaine, destinées au contrôle des médicaments à usage humain ou vétérinaire et des substances qui entrent dans leur composition.

II.1. Echantillonnage et prélèvement :

Trois (03) matière première ont fait l'objet de notre étude ; A savoir un principe actif la Cyproheptadine Chlorhydrate et deux conservateurs antimicrobiens à savoir : le Methyle Parabène et le Propyle Parabène.

Tableau 01 : Informations concernant les trois échantillons étudiés

Echantillons	Date de prélèvement	Numéro de lot	Date de fabrication	Date de péremption
Cyprohéptadine Chlorhydrate	08/04/2018	18BP062	01/01/2018	31/12/2022
Méthyl Parabène	08/04/2018	17BP075	10/02/2017	10/02/2020
Propyl Parabène	08/04/2018	15BP112	07/03/2015	07/03/2020

Pour chacune des matières premières un prélèvement a été réalisé. Le prélèvement des produits doit être réalisé selon un plan d'échantillonnage qui respecte les principes d'intégrité et de représentativité du lot, et l'asepsie pour le prélèvement destiné au contrôle microbiologique.

II.1.1. Prélèvement des matières premières :

Un prélèvement représentatif a été effectué à partir des sacs en polyéthylène d'un seul lot à l'aide d'une sonde métallique stérile qui permet de prélever à trois niveaux. La Cyproheptadine Chlorhydrate ainsi que les conservateurs antimicrobiens sont mis dans des sacs en plastique pour prélèvement fermé hermétiquement. Les sacs en plastiques ont été étiquetés en précisant le nom du produit et la date du prélèvement.

II.2. Contrôle physicochimique des matières premières :

II.2.1. Contrôle physicochimique de la Cyproheptadine Chlorhydrate :

II.2.1.1. Identification physicochimique de la Cyproheptadine Chlorhydrate

Le contrôle physicochimique de la Cyproheptadine Chlorhydrate consiste en une identification du principe actif :

a. Aspect :

Contrôler à l'œil nu l'aspect et la couleur du principe actif. La Cyproheptadine Chlorhydrate est une poudre cristalline, blanche à légèrement jaunâtre, inodore ou pratiquement inodore.

b. Solubilité :

Tableau 02 : La pesée de matière première en fonction de la nature de solubilité

Description / Terme	1 g de substance / ml de solvant
Très soluble	**1g / inférieur à 1ml**
Facilement soluble	**1g / de 1 ml à 10 ml**
Soluble	**1g / de 10 ml à 30 ml**
Assez soluble	**1g / de 30 ml à 100 ml**
Peu soluble	**1g / de 100 ml à 1000 ml**
Très peu soluble	**1g / de 1000 ml à 10000 ml**
Pratiquement insoluble	**1g / plus de 10000 ml**

Facilement soluble dans le méthanol.

Soluble dans le chloroforme.

Assez soluble dans l'alcool.

Peu soluble dans l'eau.

Pratiquement insoluble dans l'éther

c. Identification :

Identification par Infrarouge :

Principe :

Un spectre infrarouge est obtenu en faisant passer un rayonnement infrarouge à travers un échantillon et en déterminant quelle fraction du rayonnement incident est absorbée à une énergie donnée. L'énergie à laquelle un pic dans un spectre d'absorption apparaît correspond à la fréquence d'une vibration d'une partie de l'échantillon molécule (Barbara et al. 1997).

Le spectre obtenu à partir de la substance à examiner correspond à celui obtenu à partir de l'étalon de référence.

Identification par HPLC :

Le temps de rétention du pic correspondant à la Cyproheptadine Chlorhydrate dans la solution à examiner correspond à celui obtenu dans la solution standard.

Identification par UV :

Principe :

Lorsqu'une molécule ou un ion polyatomique est excité par un faisceau de photons dans le domaine de l'UV-visible, un électron d'une orbitale moléculaire de basse énergie peut passer vers une orbitale d'énergie plus élevée. Du fait du nombre important de niveaux d'énergie vibrationnelle, une transition entre deux niveaux d'énergie électronique apparait pour une large gamme de longueur d'onde dans le domaine du visible : de nombreuses raies sont accolées et on observe un spectre de bandes (Mesplède et al. 2004).

Mode opératoire :

Solution échantillon : préparer une solution à 10 mg/ml de Cyproheptadine Chlorhydrate dans le méthanol.

Placer une goutte de cette solution dans un papier filtre, dessécher puis observer sous la lumière UV. Le test est concluant s'il y a une apparition d'une fluorescence bleu vif.

II.2.1.2. Contrôle physicochimique de la Cyproheptadine Chlorhydrate

a. Résidu à la calcination : **Limite : ≤ 0.10 %**

Mode Opératoire :

- Prendre une capsule en platine vide et la peser
- Introduire 1 g de Cyproheptadine Chlorhydrate dans la capsule
- Chauffer doucement jusqu'à complète carbonisation, puis laisser refroidir
- Rajouter quelques gouttes d'acide sulfurique puis chauffer sur bec benzène jusqu'à complète disparition de fumées, puis refroidir dans un dessiccateur

Peser et calculer la masse du résidu avec la formule suivante :

$$\text{Pourcentage des cendres sulfuriques} = [(P_{av}-P_{ap})/P_{av}] \times 100$$

P_{av} : Pesée avant calcination

P_{ap} : Pesée après calcination

b. Acidité : **Limite : volume NaOH 0.1 N ≤ 0.15 ml**

Préparer une solution à 40 mg/ml de Cyprohéptadine Chlorhydrate dans le méthanol.

A 25 ml de cette solution, ajouter du rouge de méthyle. Le virage de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0.15 ml d'hydroxyde de sodium 0.1 N (0.05 % d'HCL).

c. Teneur en eau par Karl Fisher : **Limite : 7.00 % à 9.00 %**

Déterminer sur 100 mg de la substance à examiner, calculer la teneur en eau en utilisant la formule suivante :

$$Teneur\ en\ eau\ (\%) = \frac{V \times F \times 100}{P}$$

V : volume de la solution KF

F : facteur de la solution de dosage Karl Fisher mg/ml

P : pesée de l'échantillon

d. Impuretés organiques : par HPLC

Solution tampon : dissoudre 6.1 g de phosphate de potassium monobasique dans 900 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 4.5 avec de l'acide phosphorique puis compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Solution A : Acétonitril + Tampon (40 : 60)

Solution B : Acétonitril + Tampon (60 : 40)

Phase mobile :

Tableau 03 : Changement de la phase mobile A et B avec le temps

Temps (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	100	0
10.0	100	0
10.1	0	100
35.0	0	100

Solution de conformité de système : préparer une solution contenant 0.02 mg/ml de Cyproheptadine Chlorhydrate SCR, Cyprohéptadine composé apparente A SCR, Amitriptyline composé apparente A SCR, Cyprohéptadine composé apparente C SCR dans la solution A.

Solution standard : préparer une solution contenant 0.002 mg/ml de Cyprohéptadine Chlorhydrate SCR, Cyprohéptadine composé apparente A SCR, Amitriptyline composé apparente A SCR et Cyprohéptadine composé apparente C SCR dans la solution A à partir de la solution de conformité de système.

Solution à examiner : préparer une solution à 2 mg/ml de Cyprohéptadine Chlorhydrate dans la solution A.

Conditions chromatographiques :

- Colonne Packing L7 (5 µm), 25 cm × 4.6 mm.
- Longueur d'onde : 230 nm.

- Volume d'injection : 10 µl
- Débit : 1.0 ml/min

Conformité du système : solution standard, solution de conformité de système :

Résolution : au minimum 7.0 entre le pic du Cyprohéptadine Chlorhydrate et Cyprohéptadine composé apparente C (solution de conformité de système).

RSD : au maximum 15.0 % pour le Cyprohéptadine (standard solution)

Calculer le pourcentage de Cyprohéptadine composé apparente A, Amitriptyline composé apparente Cyproheptadine composé apparente C par la formule suivante :

$$\left(\frac{Ru}{Rs}\right) \times \left(\frac{Cs}{Cu}\right) \times 100$$

Ru : surface du pic de la substance apparenté dans la solution échantillon.

Rs : surface du pic approprié de la substance dans la solution standard.

Cs : concentration de la substance de référence appropriée dans la solution standard en mg/ml

Cu : concentration du Cyproheptadine chlorhydrate dans la solution échantillon en mg/ml.

Calculer le pourcentage de toute autre impureté individuelle par la formule suivante :

$$\left(\frac{Ru}{Rs}\right) \times \left(\frac{Cs}{Cu}\right) \times 100$$

Ru : surface du pic de l'impureté individuelle dans la solution échantillon

Rs : surface du pic de la Cyproheptadine chlorhydrate dans la solution standard

Cs : concentration de la Cyproheptadine chlorhydrate SCR dans la solution standard en mg/ml

Cu : concentration du Cyproheptadine chlorhydrate dans la solution échantillon en mg/ml

Tableau 04 : Les limites de substances apparentées

Nom	Temps de rétention relative	Limite ≤ (%)
Cyprohéptadine composé apparente C	0.7	0.15
Cyprohéptadine	1.0	-
Amitriptyline composé apparente A	2.6	0.15
Cyproheptadine composé apparente A	3.9	0.15
Toute autre impureté	-	0.10
Totale des impuretés	-	0.5

II.2.1.2. Dosage par potentiometrie : Limite : 98.50 % à 100.50 % en sba

Principe :

Dans un dosage potentiométrique la valeur de la solution inconnue est déterminée par le biais d'une courbe d'étalonnage établie au préalable avec des concentrations connues. La courbe d'étalonnage nécessaire pour effectuer un dosage potentiométrique suppose que celle-ci soit établie avec des solutions de composition proche de celle de la solution inconnue pour ce qui concerne les espèces autres celle à mesurer (Durand, 2010).

Mode opératoire :

Dissoudre 250 mg de Cyproheptadine chlorhydrate dans 55 ml d'un mélange d'alcool et acide chlorhydrique 0.01 N (50 : 5). Déterminer le point final de titrage par potentiomètrie avec l'hydroxyde de sodium 0.1 N. Effectuer un essai blanc avec 55 ml du mélange alcool + acide chlorhydrique 0.01 N (50 : 5). Chaque 1 ml d'hydroxyde de sodium 0.1 N équivalent à 32.39 mg de Cyproheptadine chlorhydrate (C21H21N, HCL).

II.2.2.1. Identification physicochimique du Propyl Parabène (Parahydroxybenzoate de propyl)

a. Aspect :

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

b. Solubilité :

- Très peu soluble dans l'eau
- Facilement soluble dans l'éthanol 96 % et dans le méthanol.

c. Identification :

➢ **Point de fusion :** **Limite : 96 °C à 99 °C**

Principe :

Sur le plan thermodynamique, la température de fusion est la température à laquelle les deux phases liquide et solide sont en équilibre (Mesplède et al. 2004)

Le point de fusion d'un solide est la température à laquelle le réseau cristallin s'effondre, et passe à l'état liquide (Kotz et al. 2006)

Mode Opératoire :

Prendre une quantité du Propyl Parabène à l'aide d'un tube capillaire à une seule ouverture, puis mettre le tube dans l'appareil de mesure de point de fusion et à l'aide de l'oculaire de l'appareil de point de fusion on observe la fusion et on enregistre la température nécessaire à la fusion du Propyl Parabène qui s'affiche sur l'appareil.

➢ **Infrarouge :**

Comparaison : parahydroxybenzoate de propyl SCR.

➢ **Chromatographie sur couche mince :**

Principe :

C'est une technique d'analyse qui permet de suivre l'avancement d'une réaction, de visualiser la pureté des produits ou de connaitre la composition d'un mélange. Cette méthode qualitative peut être aussi préparative et permet ainsi de séparer les produits en petites quantités. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile (éluant) est un solvant ou un mélange de solvants, qui se déplace par capillarité le long d'une phase appelée stationnaire. Cette phase stationnaire souvent additionnée d'un liant (plâtre par exemple) est fixée soit sur une plaque de verre, soit sur un support en plastique ou en aluminium (Mesplède et al. 2004).

Mode opératoire :

Solution à examiner (a) :

Dissoudre 0.10 g de parahydroxybenzoate de propyl dans l'acétone et compléter à 10 ml avec le même solvant.

Solution à examiner (b) :

Prélever 1 ml de solution à examiner (a) et compléter à 10 ml avec l'acétone.

Solution témoin (a) :

Dissoudre 10 mg de parahydroxybenzoate de propyl SCR dans de l'acétone et compléter à 10 ml avec le même solvant.

Solution témoin (b) :

Dissoudre 10 mg de parahydroxybenzoate d'éthyle SCR dans 1 ml de solution à examiner (a) et compléter à 10 ml avec de l'acétone.

Mode Opératoire :

Déposer 2 µL de solution à examiner (b) et des solutions témoins (a) et (b) sur une plaque en gel de silice octadécylsilylé F254 pour CCM, puis mettre la plaque dans une chambre de CCM qui contient la phase mobile qui est composée acide acétique glacial, eau distillée, méthanol (1 : 30 : 70 V/V/V). Une fois que les échantillons migrent sur les 2/3 de la plaque on l'enlève et on la laisse sécher à l'air. La détection se fait sous lumière ultraviolette.

Conformité du système : solution témoin (b) :

Le chromatogramme présente 2 taches principales nettement séparées.

Résultats : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

II.2.2.2. Contrôle physicochimique Propyl Parabène (Parahydroxybenzoate de propyl)

a. Aspect de la solution :

Solution S : Dissoudre 1.0 g de parahydroxybenzoate de propyl dans de l'éthanol à 96 % et compléter à 10 ml avec le même solvant.

La solution S est limpide et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB6.

b. Acidité : Limite ≤ 0.1 ml de NaOH 0.1 M

A 2 ml de la solution S, ajouter 3 ml d'éthanol à 96 %, 5 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone et 0.1 ml de solution de vert de bromocrésol. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 0.1 ml d'hydroxyde de sodium 0.1 M.

c. Substances apparentées par HPLC : Limite : impureté A : ≤ 0.50 %

Impuretés non spécifiées : ≤ 0.50 %

Total : ≤ 1.0 %

Solution à examiner : dissoudre 50.0 mg de parahydroxybenzoate de propyl dans 2.5 ml de méthanol et compléter à 50.0 ml avec la phase mobile. Prélever 10.0 ml de solution et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (a) : Dissoudre 5 mg d'acide 4-hydroxybenzoique (impureté A), 5 mg de parahydroxybenzoate d'éthyle (Impureté C) et 5 mg de parahydroxybenzoate de propyl dans la phase mobile et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile. Prélever 1.0 ml de cette solution et compléter à 10.0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (b) : Dissoudre 50.0 mg de parahydroxybenzoate de propyl SCR dans 2.5 ml de méthanol et compléter à 50.0 ml avec la phase mobile. Prélever 10.0 ml de cette solution et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (c) : Prélever 1.0 ml de solution à examiner et compléter à 20.0 ml avec la phase mobile. Prélever 1.0 ml de cette solution et compléter à 10.0 ml avec la phase mobile.

Colonne :

Dimensions : L = 15 cm, d = 4.6 mm, phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie (5µm).

Phase mobile : solution de phosphate monopotassique à 6.8 g/l, méthanol (35 : 65 V/V)

Débit : 1.3 ml/min

Détection : spectrophotomètre à 272 nm.

Injection : 10 µl de solution à examiner et des solutions témoins (a) et (c).

Enregistrement : 2.5 fois le temps de rétention du parahydroxybenzoate de propyl.

Rétention relative par rapport au parahydroxybenzoate de propyl (temps de rétention environs 4.5 min) : impureté A = environ 0.3 : impureté C = 0.7.

Conformité du système : solution témoin (a) :

Résolution : au minimum 3.0 entre les pics dus à l'impureté C et au parahydroxybenzoate de propyl.

Limite :

Facteur de correction : pour le calcul de la teneur, multiplier la surface du pic de l'impureté A par 1.4.

Impureté A : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (0.5 pour cent)

Impureté non spécifiées : pour chaque impureté, au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (C) (0.5 pour cent).

Total : au maximum 2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (C) (1.0 pour cent).

Limite d'exclusion : 0.2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (C) (0.1 pour cent).

d. Cendres Sulfuriques : **Limite : ≤ 0.1 %**

Déterminer sur 1.0 g de parahydroxybenzoate de propyl.

e. Dosage HPLC : **Limite : 98.00 % à 102.00 %**

La chromatographie liquide à haute performance est la technique de séparation analytique la plus utilisée. Cette popularité est due à sa sensibilité, sa facilité d'adaptation à des analyses quantitatives précises, au fait qu'elle permet la séparation d'espèces non volatiles ou fragiles au point de vue thermique, et par-dessus tout, à son intérêt primordial dans l'industrie, ainsi que dans de nombreux domaines scientifique et institutionnels (Skoog et al. 2003).

Mode opératoire :

Par chromatographie liquide selon les indications de l'essai des substances apparentées avec la modification suivante.

Injection : solution à examiner et solution témoin (b)

Calculer la teneur pour cent en C10H12O3 en tenant compte de la teneur déclarée du parahydroxybenzoate de propyl SCR.

II.3.1. Identification physicochimique du Méthyle Parabène (parahydroxybenzoate de méthyle)

a. Aspect :

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores.

b. Solubilité :

- Très peu soluble dans l'eau
- Facilement soluble dans l'éthanol à 96 % et dans le méthanol.

c. Identification :

- **Point de fusion :** **Limite 125°C à 128°C**

Mode Opératoire :

Prendre une quantité du Méthyle Parabène à l'aide d'un tube capillaire à une seule ouverture, puis mettre le tube dans l'appareil de mesure de point de fusion et à l'aide de l'oculaire de l'appareil de point de fusion on observe la fusion et on enregistre la température nécessaire à la fusion du Méthyle Parabène qui s'affiche sur l'appareil.

- **Infrarouge :**

Comparaison avec parahydroxybenzoate de méthyle SCR.

- **Chromatographie sur couche mince :**

Solution à examiner (a) : Dissoudre 0.10 g de parahydroxybenzoate de méthyle dans de l'acétone et compléter à 10 ml avec le même solvant.

Solution à examiner (b) : prélever 1 ml de la solution à examiner (a) et compléter à 10 ml avec de l'acétone.

Solution témoin (a) : Dissoudre 10 mg de parahydroxybenzoate de méthyle SCR dans de l'acétone et compléter à 10 ml avec le même solvant.

Solution témoin (b) : Dissoudre 10 mg de parahydroxybenzoate d'éthyle SCR dans 1 ml de solution à examiner (a) et compléter à 10 ml avec de l'acétone.

Mode Opératoire :

Déposer 2 µL de solution à examiner (b) et des solutions témoins (a) et (b) sur une plaque en gel de silice octadécylsilylé F254 pour CCM, puis mettre la plaque dans une chambre de CCM qui contient la phase mobile qui est composée acide acétique glacial, eau distillée, méthanol (1 : 30 : 70 V/V/V). Une fois que les échantillons migrent sur les 2/3 de la plaque on l'enlève et on la laisse sécher à l'air. La détection se fait sous lumière ultraviolette.

Conformité du système : solution témoin (b) :

Le chromatogramme présente 2 taches principales nettement séparées.

Résultats : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale au chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

II.3.2. Contrôle physicochimique du Méthyle parabène (Parahydroxubenzoate de Méthyle)

a. Aspect de la solution :

Solution S : dissoudre 1.0 g de parahydroxybenzoate de méthyle dans de l'éthanol à 96 % et compléter à 10 ml avec le même solvant.

La solution S est limpide et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB6.

b. Acidité : **Limite : ≤ 0.1 ml du NaOH 0.1 M**

A 2 ml de la solution S, ajouter 3 ml d'éthanol à 96 %, 5 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone et 0.1 ml de solution de vert de bromcrésol. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 0.1 ml d'hydroxyde de sodium 0.1 M.

c. Substances apparentées par HPLC : **Limite : impureté A : ≤ 0.5 %**

Impureté non spécifiées : ≤ 0.5 %

Total : ≤ 1.0 %

Solution à examiner : dissoudre 50.0 mg de parahydroxybenzoate de méthyle dans 2.5 ml de méthanol et compléter à 50.0 ml avec la phase mobile. Prélever 10.0 ml de solution et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (a) : Dissoudre 5 mg d'acide 4-hydroxybenzoique (impureté A) et 5 mg de parahydroxybenzoate de méthyle dans la phase mobile et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile. Prélever 1.0 ml de cette solution et compléter à 10.0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (b) : Dissoudre 50.0 mg de parahydroxybenziate de méthyle SCR dans 2.5 ml de méthanol et compléter à 50.0 ml avec la phase mobile. Prélever 10.0 ml de cette solution et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (C) : Prélever 1.0 ml de solution à examiner et compléter à 20.0 ml avec la phase mobile. Prélever 1.0 ml de cette solution et compléter à 10.0 ml avec la phase mobile.

Colonne :

Dimensions : L = 15 cm, d = 4.6 mm, phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographue (5 µm).

Phase mobile : solution de phosphate monopotassique à 6.8 g/L, méthanol (35 : 65 V/V)

Débit : 1.3 ml/min

Détection : spectrophotomètre à 272 nm.

Injection : 10 µL de solution à examiner et des solutions témoins (a) et (c).

Enregistrement : 5 fois le temps de rétention de parahydroxybenzoate de méthyle.

Rétention relative par rapport au parahydroxybenzoate de méthyle (temps de rétention = environ 2.3 min) impurté A = environ 0.6.

Conformité du système : solution témoin (a) :

Résolution : au minimum 2.0 entre les pics due à l'impureté A et au parahydroxybenzoate de méthyle.

Limite :

Facteur de correction : pour le calcul de la teneur, multiplier la surface du pic de l'impureté A par 1.4.

Impureté A : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (0.5 pour cent),

Impureté non spécifiées : pour chaque impureté, au maximum ka surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (0.5 pour cent),

Total : au maximum 2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (1.0 pour cent),

Limite d'exclusion : 0.2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (0.1 pour cent).

d. Cendres sulfuriques : **Limite : ≤ 0.1 %**

La détermination des cendres sulfuriques permet de mettre en évidence la présence d'impuretés minérales, les cendres peuvent être obtenues par simple calcination au four à moufle jusqu'à poids constant (Lespagnol, 1979).

Mode opératoire :

- Prendre une capsule en platine vide et la peser
- Introduire 1 g de Methyle Paraben dans la capsule puis ajouter 1 ml d'acide sulfurique R
- Chauffer doucement jusqu'à complète carbonisation, puis laisser refroidir
- Rajouter quelques gouttes d'acide sulfurique puis chauffer sur bec benzène jusqu'à complète disparition de fumées
- Calciner au four à moufle de 600-800 °C, puis refroidir dans un dessiccateur
- Peser et calculer la masse du résidu avec la formule suivante :

$$\text{Pourcentage des cendres sulfuriques} = [(P_f\text{-}T)/P_e] \times 100$$

P_f : Poids final P_e : Prise d'essai T : La tare

e. Dosage HPLC : **Limite : 98 % à 102 %**

Par chromatographie liquide selon les indications de l'essai des substances apparentées avec la modification suivante :

Injection : solution à examiner et solution témoin (b)

Calculer la teneur pour cent en C8H8O3 en tenant compte de la teneur déclarée du parahydroxybenzoate de méthyle SCR.

III. Mise au point et préparation galénique :

Avant qu'on commence notre préparation du sirop Heptagyl 0.04 % ® à différentes concentration on doit stériliser toute notre verrerie et matériel afin d'éviter d'éventuelles contaminations de notre produit.

On a fait la préparation de 7 échantillons répartis selon le tableau suivant :

Tableau 05 : Composition des mélanges semi fini en principe actif et parabènes

Echantillon	Cyproheptadine	Methyle Parabène	Propyl Parabène
Heptagyl 125 %	100 %	125 %	125 %
Heptagyl 100 %	100 %	100 %	100 %
Heptagyl 75 %	100 %	75 %	75 %
Heptagyl 50 %	100 %	50 %	50 %
Methyle	100 %	100 %	0 %
Propyl	100 %	0 %	100 %
Placebo	100 %	0 %	0 %

Pour une préparation de 100 ml du sirop on a besoin :

Tableau 06 : Composition du sirop Heptagyl 0.04 % ® dans une quantité de 100 ml

Principe actif et excipients	Quantité g/100 ml	Numéro de lot
Cyproheptadine Chlorhydrate	0.043	18BP062
Methyle Parabène	0.18	17BP075
Propyl Parabène	0.02	15BP112
Saccharose	50	18BP006
Acide citrique	0.004	17AP153
Ethanol 96 %	2 ml	18BP004
Arôme de cerise	0.03 ml	17BP116

On a fait une préparation de 200 ml pour chaque sirop comme l'explique le tableau suivant :

Tableau 07 : Pesées des mélanges semi fini pour une quantité de 200 ml

Echantillon g/200 ml	Heptagyl 125 %	Heptagyl 100 %	Heptagyl 75 %	Heptagyl 50 %	Heptagyl Methyle	Heptagyl Propyl	Heptagyl Placebon
Cyproheptadine Chlorgydrate	0.086 g	0.086 g	0.086 g	0.086 g	0.086 g	0.086 g	0.086 g
Methyle Parabène	0.45 g	0.36 g	0.27 g	0.18 g	0.36 g	0 g	0 g
Propyl Parabène	0.05 g	0.04 g	0.03 g	0.02 g	0 g	0.04 g	0 g
Acide Citrique	0.008 g	0.008 g	0.008 g	0.008 g	0.008 g	0.008 g	0.008 g
Saccharose	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g	100 g
Ethanol 96 %	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Arôme de cerise	0.06 ml	0.06 ml	0.06 ml	0.06 ml	0.06 ml	0.06 ml	0.06 ml

Etapes de préparation du sirop : (Documents SAIDAL, 2017)

Etape 1 : préparation du sirop simple

- Chauffer 0.733 L d'eau purifiée à 40 °C dans une éprouvette de 2 litres qu'on a stérilisé auparavant.
- Une fois la température de 40 ° C est atteinte on ajoutera une quantité de saccharose de l'ordre de 1 Kg. On laissera sous agitation pendant 1 heure jusqu'à parfaite dissolution.
- On complètera avec de l'eau purifier jusqu'à 1.8 Litre et on laissera refroidir puis on termine avec la filtration de notre sirop simple à travers un filtre à membrane de 0.45µm.

Etape 2 : préparation de la solution alcoolique

- Pour nos 7 préparations on prendra 7 fioles stérilisées de 200 ml, dans chaque fiole on mettra 4 ml d'éthanol 96 %, qui, sous agitation on lui rajoute 0.086 g de Cyproheptadine Chlorhydrate et on laissera sous agitation pendant 15 minutes.

- Dans les mêmes solutions alcooliques on rajoute 0.08 g d'acide citrique et on laisse sous agitation pendant 5 minutes.
- On ajoute la quantité du méthyle parabène décrite dans le tableau 07 et on laissera sous agitation pendant 1 heure.
- On rajoute la quantité du propyl parabène décrite dans le tableau en haut et on laisse sous agitation pendant 30 minutes.
- On doit vérifier la dissolution du principe actif ainsi que des conservateurs.

Etape 3 : préparation du mélange final

- Dans chacune des 7 fioles on rajoute la quantité de 180 ml de sirop simple qu'on a déjà préparé et on laisse sous agitation pendant 30 minutes.
- On ajoute sous agitation, 0.06 ml d'arôme de cerise, puis on ajuste jusqu'à trait de jauge de chacune des fioles avec de l'eau purifiée.

Etape 4 : Filtration et stockage

- Dans une dernière étape on fait la filtration de nos 7 mélanges à l'aide des filtres 0.45 µm et on stocke nos mélanges dans des flacons ambrés à une température ambiante de 25 °C.

III.1. Contrôle physico-chimique des mélanges semi-finis :

a. Dosage du principe actif : titre par chromatographie à haute performance phase liquide (HPLC) Limite : 90-110 % en Cyproheptadine chlorhydrate

Principe :

La chromatographie liquide à haute performance est une technique qui sépare les composants d'un mélange en raison du temps pris pour chaque composant de se déplacer à travers une phase stationnaire, lorsqu'ils sont transportés au travers d'une phase mobile. La composition de la phase mobile qui est utilisée dépend à la fois de la phase stationnaire et la nature des composés analysés (McPolin, 2009).

Conditions opératoires :

Colonne : octadécylsiliyle C 18 : 15 cm × 3.9 mm × 5 µm

Débit : 1.0 ml/min

Longueur d'onde : λ = 285 nm

Volume d'injection : 10 µL

Température : ambiante

La phase mobile est composée de : Acétonitrile pour HPLC/Isopropanol/Acide méthane sulfonique à 3 ‰ : 20/15/65 (V/V/V), agiter puis ajuster le pH à 4.0 ± 0.05 avec le triéthylamine puis filtrer avec un filtre de 0.45 µm et dégazer pendant 10 minutes.

Préparation de la solution standard :

- Peser 20 mg de standard de référence Cyprohéptadine chlorhydrate dans une fiole jaugée 100 ml.
- Faire dissoudre avec la phase mobile puis compléter jusqu'à trait jauge avec le même solvant.
- Prélever de la solution précédente 1 ml dans une fiole de 10 ml puis compléter jusqu'à trait jauge avec la phase mobile (la concentration final de la solution standard est 0.02 mg/ml)

Préparation de la solution échantillon :

- Prélever 5 ml de l'échantillon dans une fiole de 100 ml, ajouter 50 ml de la phase mobile bien agiter, puis compléter jusqu'à trait jauge avec le même solvant.

Formule de calcul :

Le titre en Cyprohéptadine chlorhydrate dans le mélange final est donné par la formule suivante :

Titre = A ech / A std × C (std) × Vd ech / P ech × Puiss (std) × 100/1000 × 100/0.04

A ech : Aire de l'échantillon

A std : Aire de standard de référence

Puiss (std) : puissance en mg/mg du standard de référence

C std : concentration de standard de référence en mg/ml

P ech : prise d'essai de l'échantillon

Vd ech : volume de dilution de l'échantillon

b. Dosage des parabènes : dosage par chromatographie à haute performance phase liquide (HPLC) :

Limite de parahydroxybenzoate de méthyle : 0.162 g/100 ml – 0.198 g/100 ml

Limite de parahydroxybenzoate de propyl : 0.018 g/100 ml – 0.022 g/100 ml

Conditions opératoires :

Colonne : octadécylsiliyle C 18 : 15 cm × 3.9 mm × 5 µm

Débit : 1.0 ml/min

Longueur d'onde : λ = 254 nm

Volume d'injection : 10 µL

Température : ambiante

La phase mobile est composée de : Acétonitrile pour HPLC/Isopropanol/Acide méthane sulfonique à 3‰ : 20/15/65 (V/V/V), agiter puis ajuster le pH à 4.0 ± 0.05 avec le triéhylamine puis filtrer avec un filtre de 0.45 µm et dégazer pendant 10 minutes.

Préparation de la solution standard :

- Peser 180 mg de standard de référence de parahydroxybenzoate de méthyle et 20 mg de standard de référence de parahydroxybenzoate de propyl dans une fiole jaugée de 100 ml.
- Faire dissoudre avec 50 ml de la phase mobile puis compléter jusqu'à trait jauge avec le même solvant.
- Prélever de la solution précédente 1 ml dans une fiole de 20 ml puis compléter jusqu'à trait jauge avec la phase mobile (la concentration final de la solution standard est 0.09

mg/ml en parahydroxybenzoate de méthyle et de 0.02 mg/ml en parahydroxybenzoate de propyl).

Préparation de la solution échantillon :

- Prélever 5 ml de l'échantillon dans une fiole de 100 ml, ajouter 50 ml de la phase mobile bien agiter, puis compléter jusqu'à trait jauge avec le même solvant.

Formule de calcul :

Le titre en parahydroxybenzoate de méthyle dans le mélange final est donné par la formule suivante :

Titre (g/100ml) = A ech/ A std × C std × Vd ech/ P ech × Puiss (std)/ 100 × 100 × 10^{-3}

A ech : aire de l'échantillon

A std : aire de standard de référence

Puiss (std) : puissance en % du standard de référence

C std : concentration de standard de référence en mg/ml

P ech : prise d'essai de l'échantillon

Vd ech : volume de dilution de l'échantillon

Le titre en parahydroxybenzoate de propyl dans le mélange final est donné par la formule suivante :

Titre (g/100ml) = A ech/ A std × C std × Vd ech/ P ech × Puiss std / 100 × 100 × 10^{-3}

A ech : aire de l'échantillon

A std : aire de standard de référence

Puiss std : puissance en % du standard de référence

P ech : prise d'essai de l'échantillon

Vd ech : volume de dilution de l'échantillon

Parahydroxybenzoate de méthyle > en premier temps de rétention

Cyproheptadine chlorhydrate > en deuxième temps de rétention

Parahydroxybenzoate de propyl > en troisième temps de rétention

c. pH : Limite : 3.5 – 4.05

Le pH est une grandeur qui présente conventionnellement la concentration en ions hydrogène dans une solution aqueuse.

d. Densité relative : Limite : (1.160 – 1.200)

Faire la densité du mélange final par rapport à l'eau distillée.

III.2. Contrôle Microbiologique des mélanges semi-finis :

Les microorganismes se rencontrent partout, dans tous les milieux, dans l'eau, dans l'air, dans le sol et aussi dans les aliments que nous consommons. On ne peut les observer que grâce à un microscope. Selon leur taille et leur mode de vie, les microorganismes sont habituellement classés en cinq grandes catégories : Les bactéries, les levures et les moisissures, les virus et les protozoaires (FAO, 2007)

Les contaminations microbiennes peuvent être analysées par différents procédés. Les méthodes de dénombrement microscopique ou après culture permettent leur mise en évidence et les méthodes biochimiques et sérologiques servent à caractériser précisément la nature des micro-organismes. Pour la mise en évidence par la culture, on se sert de milieux de culture liquides ou solides dans ou sur lesquels les micro-organismes se multiplient, jusqu'à former des colonies visibles. On ne peut faire d'appréciation quantitative qu'avec un milieu de culture solide car on peut alors compter les colonies qui se développent.

Préparation des échantillons :

- Sirop semi fini : on prélève 10 ml/100 ml de solution tampon pH 7 (solution A)

III.2.1. Dénombrement des germes aérobies totaux et levures et moisissures totales :

Les germes aérobies mésophile totaux représentent l'ensemble des micro-organismes capables de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissance comprises entre + 20°C et + 45°C. Cette microflore peut comprendre des microorganismes pathogènes pour l'homme et l'animal mais aussi des microorganismes d'altération variés. Le

dénombrement des germes aérobies mésophile totaux est un indice de la qualité intrinsèque et un indice de la qualité marchande. Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile reste la meilleure méthode permettant d'estimer l'indice de salubrité et de qualité dans le contrôle industriel (Bonnefoy et al. 2002).

Les levures et les moisissures sont classées comme des champignons. Médicalement, les champignons sont un groupe extrêmement important de microbes, ils peuvent être responsables d'un certain nombre de maladies potentiellement mortelles chez l'homme comme la blastomycose, l'histoplasmose, la coccidioïdomycose etc … mais un nombre important de champignons sont d'une grande utilité pour l'humanité en termes de production de pain, des enzymes, des antibiotiques et des protéines recombinantes (Denyer et al, 2011).

Principe :

L'association entre la tryptone et la peptone papaïnique de soja réalise une synergie entre l'apport protidique de la caséine et l'apport glucidique du soja, permettant ainsi d'obtenir une croissance optimale pour un nombre élevé de germes exigeants et non exigeants. Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique (Solabia, 2013).

- Filtrer 10 ml de la solution A en deux fois à travers deux filtres membranes de porosité 0.45 µm stériles ;
- Rincer chaque filtre avec 100 ml de solution tampon peptoné au chlorure de sodium pH7 « Annexe 02 » ;
- Mettre un filtre dans une boite de Pétri contenant du milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (DGAT) (voire annexe) ;
- Mettre le deuxième filtre dans une boite contenant du milieu Sabouraud Dextrose Gélosé (DMLT« Annexe 02 » ;
- Incuber la première boite à une température entre (30-35 °C) pendant 5 jours et la deuxième (20-25 °C) pendant 5-7 jours ;
- Calculer le nombre d'UFC par millilitre ou pas gramme de produit.

III.2.2. *Escherichia coli* :

E. coli est un commensal inoffensif de l'intestin humain, certaines souches (identifié comme particulier O, H et K sérotypes) peuvent provoquer des infections du tractus gastro-intestinal, des voies urinaires, des voies biliaires, des voies respiratoires inférieures, de la

circulation sanguine, syndrome hémolytique et urémique (SHU), rectocolite hémorragique et la méningite néonatale (Elliott et al. 2011).

Principe :

Les composants sélectifs du milieu de MacConkey sont les sels biliaires et le cristal violet, qui inhibent la croissance des bactéries gram-positives. La présence de lactose et de rouge neutre, un indicateur de pH, différencient les bactéries gram-négatives en fonction des produits libérés lorsqu'elles métabolisent le lactose, Celles qui libèrent des substances acides donnent des colonies rouges comme *E. coli* (Sherwood et al. 2010).

Mode opératoire :

- Prélever 10 ml de la solution A et ensemencer 90 ml de liquide aux peptones de caséine et de soja ;
- Mélanger et incuber à (30-35 °C) pendant (18-24) heures ;
- Agiter le récipient, puis transférer 1 ml du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja dans 100 ml de milieu liquide de Mac Conkey « Annexe 02 » ;
- Incuber à (42-44 °C) pendant (24 à 48) heures ;
- Repiquer sur milieu gélosé Mac Conkey Agar ;
- Incuber à (30-35 °C) pendant (18 à 72) heures.

Interprétation :

- Le produit satisfait à l'essai si aucune colonie n'est observée.
- La croissance de colonies indique la présence possible d'*Escherichia coli*
- Confirmer par un test d'identification API20E.

Lecture :

La présence d'*E.coli* se manifeste par des colonies colorées en rouge brique non muqueuse entourées parfois d'une zone de précipitation rougeâtre.

III.3. Contrôle toxicologique (test d'innocuité) des mélanges semi-finis :

Avant qu'un médicament ne soit soumis aux essais cliniques, celui-ci doit subir des épreuves de toxicité. L'évaluation de l'innocuité d'une substance débute souvent par des essais *in vitro* et *in vivo* sur des cultures cellulaires obtenues par génie génétique, ou sur des

souris transgéniques en vue d'examiner les effets éventuels sur la reproduction des cellules, et de vérifier l'absence de propriétés cancérigènes (Patrick, 2003).

Objectif :

Le test d'innocuité a pour objectif de vérifier que le médicament ne présente aucun risque de toxicité pour la santé du patient, et pour cela on administre chez des souris une dose unique efficace (non toxique) relativement élevée par rapport à la dose thérapeutique du principe actif, et après 48 heures on observe s'il y a présence d'anomalies ou de mortalité chez les souris.



Figure 06 : Souris *Mus Musculus* avant administration per os des mélanges

Elevage des souris étudiées :

Les souris utilisées appartiennent à l'espèce *Mus Musculus* de sexe mâle (Figure 06), elles sont élevées dans des cages solides en plastique avec un couvercle en acier inoxydable dans les conditions suivantes : la température : 25 ± 2°C, degré d'hygrométrie (humidité) : 55 ± 1 %, et un éclairage naturel maintenu 12 heures sur 24 heures. Elles reçoivent une alimentation standard, équilibrée, sous forme de granulés provenant de l'ONAB (Office National des Aliments de Bétail). L'eau du robinet est donnée aux souris dans des biberons installés sur les cages.

Mode opératoire : (Documents SAIDAL, 2017)

- le volume administré aux souris est de 0.5 ml et l'administration se fera per os (voie orale) ;
- les souris sont mises à jeun 24 heures avant le gavage, l'eau est donnée *ad libitum* (à volonté)
- immobiliser la souris, ensuite au niveau du cou tirer la peau ;
- à l'aide d'une seringue de gavage spéciale souris, prélever 0.5 ml de chaque échantillon de Heptagyl 0.04 % ®;
- introduire la sonde de gavage dans l'œsophage de la souris doucement et avec précision pour éviter le risque de blesser de tuer l'animal.

Expression des résultats :

Pour confirmer que le médicament n'est pas toxique et que l'essai est satisfaisant il ne faut pas qu'il y'ait des mortalités ou des anomalies chez les souris 48 heures après l'administration de la dose de 0,5 ml de Heptagyl 0.04 % ®.

- Si une mortalité ou une anomalie chez une ou plusieurs souris est constaté l'expérience est refaite.
- Si on observe encore des anomalies ou des mortalités dans le deuxième test, on peut conclure que le médicament est toxique.
- S'il n'y a pas de mortalités ou d'anomalies lors du deuxième test, on refait un troisième test de confirmation.

IV. Etude de la stabilité des mélanges semi-finis Heptagyl 0.04 % ® :

Un produit médicamenteux doit conserver sa qualité physique (apparence, dissolution et uniformité), chimique (activité), microbienne (stérilité ou résistance à la croissance microbienne), thérapeutique (efficacité thérapeutique) et toxicologique (augmentation de la toxicité) pendant sa durée de conservation. Au cours du développement du produit, des tests de stabilité accélérés sont effectués dans le cadre de l'optimisation de la stabilité (sélection des excipients, pH, milieu et emballage), et déterminent les conditions de stockage et la durée de conservation provisoire du produit. Les essais accélérés sont généralement effectués à des températures élevées et l'équation d'Arrhenius utilisée pour

prédire la durée de conservation à la température ambiante ou par rapport à d'autres conditions de stockage potentielles, telles que la réfrigération (Loftsson, 2014).
La durée de conservation du produit pharmaceutique fini est ensuite déterminée dans les conditions de stockage proposées avec l'emballage final. Il est basé sur des études de stabilité à long terme (en temps réel) sur un certain nombre de lots. Un test spécifique indiquant la stabilité pour la détermination quantitative de la substance médicamenteuse (l'ingrédient pharmaceutique actif) doit être inclus dans les demandes d'homologation de tous les nouveaux médicaments. Fréquemment, il est possible d'utiliser la même procédure analytique (HPLC) pour le dosage de la substance médicamenteuse et la quantification des impuretés (Loftsson, 2014).

Après avoir terminé le contrôle physicochimique et microbiologique et le test d'innocuité des produits semi fini, on a voulu voir la stabilité des conservateurs antimicrobiens après 1 mois de préparation dans un temps T1 et dans les conditions réels (T = 25 °C et humidité à 65 %) et accélérés (T = 40°C et humidité à 75 %). Le but ici est de voir est-ce que les parabènes se dégradent ou non après un mois de préparation.

Méthode :

On met nos échantillons semi fini dans des flacons ambrés fermés, dans une étuve statistique où la température est constante à T = 25 °C et l'humidité à 65 % pendant tout un mois, et d'autres échantillons semi fini toujours dans des flacons ambrés fermés, dans une étuve statistique où la température est constante à T = 40 °C et l'humidité à 75 % pendant tout un mois.

Les mêmes tests physicochimiques, microbiologiques et test d'innocuité qu'on a fait à T_0 on qu'on refait à T_1 à savoir :

- Contrôle physicochimique : Dosage par HPLC et densité relative et pH
- Contrôle Microbiologique : Recherche des et Dénombrement des germes aérobies totaux et levures et moisissures totales et de la bactérie pathogène *Escherichia coli*
- Test d'innocuité.

Résultats & Discussion

Partie III : Résultats et Discussion

I. Identification et contrôle physico-chimique de la matière première

I. 1. Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du principe actif :

Les résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du Cyproheptadine Chlorhydrate sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du principe actif

Tests	Résultats	Normes Pharmacopée Américaine (USP 40)
Identification :		
Aspect	- Poudre cristalline, blanche à légèrement jaunâtre, inodore ou pratiquement inodore	- Poudre cristalline, blanche à légèrement jaunâtre, inodore ou pratiquement inodore
Solubilité	- Facilement soluble dans le méthanol. - Soluble dans le chloroforme. - Assez soluble dans l'alcool. - Peu soluble dans l'eau. - Pratiquement insoluble dans l'éther	- Assez soluble dans l'alcool, facilement soluble dans le méthanol. Soluble dans le chloroforme et peu soluble dans l'eau et pratiquement insoluble dans l'éther.
Spectrophotométrie d'absorption par infrarouge	- Comparable avec le spectre de référence (Figure 13)	- Comparable avec le spectre de référence
Identification par HPLC	- Identique à celui de la solution standard	- Le temps de rétention dans la solution à examiner correspond à celui obtenu dans la solution standard
Identification par UV	- Apparition d'une fluorescence bleu vif	- Apparition d'une fluorescence bleu vif

Contrôle :		
Résidu à la calcination	- 0.01 %	- ≤ 0.10 %
Acidité	- 0,01 ml	- NaOH 0.1 N ≤ 0,15 ml
Teneur en eau par Karl Fisher	- 8.67 %	- 7.00 % à 9.00 %
Impuretés organique par HPLC	- Composé app C = 0.002 % - Cypro composé app A = 0.007 % - Amitriptyline app A = 0.001 % - Toute autre impureté = 0.04 % - Total des impuretés = 0.12 %	- Composé app C ≤ 0.15 % - Cyproheptadine Composé app A ≤ 0.15 % - Amitriptyline app A ≤ 0.15 % - Toute autre impureté ≤ 0.1 % - Total des impuretés ≤ 0.5 %
Dosage par Potentiométrie	- 99.93 %	- 98.50 % à 100.50 % en SBA

I. 2. Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique des conservateurs antimicrobiens :

I.2.1. Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du Propyl Parabène :

Les résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du Propyl Parabène sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 09 : Résultats de l'identification et du contrôle physicochimque du propyl parabène

Tests	Résultats	Normes Pharmacopée Européenne 2017
Identification :		
Aspect	- Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche	- Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche

Solubilité	- Très peu soluble dans l'eau - Facilement soluble dans l'éthanol 96 % et dans le méthanol	- Très peu soluble dans l'eau - Facilement soluble dans l'éthanol 96 % et dans le méthanol
Point de fusion	- 98.1 °C	- 96 °C à 99 °C
Infrarouge	- Identique à celui de la référence	- Identique à celui de la référence
Chromatographie sur Couche Mince	- La tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a)	- La tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a)
Contrôle :		
Aspect de la solution	- La solution S est limpide et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB6	- La solution S est limpide et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB6
Acidité	0.04 ml	- ≤ 0,1 ml de NaOH 0.1 M
Substances apparentés HPLC	- Impureté A = 0.02 % - Impureté non spécifiées = 0.01 % - Total = 0.03 %	- Impureté A : ≤ 0.50 % - Impuretés non spécifiées : ≤ 0.50 % - Total : ≤ 1.0 %
Cendres sulfuriques	- 0.06 %	≤ 0.1 %

Dosage HPLC	- 99.29 %	98.00 % à 102.00 %

I.2.2. Les résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du Méthyle Parabène :

Les résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du Méthyle Parabène sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Résultats de l'identification et du contrôle physicochimique du Méthyle Parabène

Tests	Résultats	Normes PE 2017
Identification :		
Aspect	- Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores	- Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores
Solubilité	- Très peu soluble dans l'eau - Facilement soluble dans l'éthanol 96 % et dans le méthanol	- Très peu soluble dans l'eau - Facilement soluble dans l'éthanol 96 % et dans le méthanol
Point de fusion	- 126.4 °C	- 125°C à 128 °C
Infrarouge	- Identique à celui de la référence	- Identique à celui de la référence
Chromatographie sur Couche Mince	- La tache (b) est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale (a)	- La tache (b) est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale (a)

Contrôle :		
Aspect de la solution	- La solution S est limpide et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB6	- La solution S est limpide et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB6
Acidité	- 0.03 ml	- ≤ 0,1 ml de NaOH 0.1 M
Substances apparentés HPLC	- Impureté A = 0.04 % - Impuretés non spécifiées = 0.02 % - Total = 0.06 %	- Impureté A : ≤ 0.50 % - Impuretés non spécifiées : ≤ 0.50 % - Total : ≤ 1.0 %
Cendres sulfuriques	- 0.001 %	≤ 0.1 %
Dosage HPLC	- 99.80 %	- 98.00 % à 102.00 %

II. Discussion :

Les résultats du contrôle physicochimique des matières premières sont conformes aux normes. Selon le Hir et al. (2011) la connaissance de la solubilité du principe actif dans l'eau et à différentes pH est essentielle car elle oriente le choix de la forme d'administration et joue un grand rôle dans la biodisponibilité.

L'aspect des solutions est limpide et incolore preuve que la matière première s'est bien dissoute. Pour la Pharmacopée Européenne (2007) un liquide est considéré comme limpide si sa limpidité est la même que celle de l'eau ou du solvant utilisé.

La teneur en eau est conforme aux normes de l'USP 40. Pour Pradeau (1992), la présence d'eau abaisse le titre de matière première. Comme l'explique Wichtl al. (2003), un pourcentage d'eau trop élevé permet à un certain nombre de réactions enzymatiques de se développer, entraînant des conséquences néfastes sur l'aspect des médicaments, leurs caractères organoleptiques, leurs propriétés thérapeutiques. En outre, une humidité résiduelle favorise le développement de microorganismes (bactéries, levures, moisissures).

Le pourcentage des cendres sulfuriques est conforme. Pour Kirkiacharian (2010) la pureté d'un principe actif est fondamentale car elle permet de s'assurer de l'absence d'impuretés de synthèse inactives voire toxiques.

Le spectre d'absorption par infrarouge du principe actif et des conservateurs antimicrobiens est conforme. Si on prend l'exemple du principe actif Cyproheptadine Chlorhydrate (Figure 8) on voit bien que la partie correspondant au nombre d'ondes supérieures à 1200 les pics caractéristiques sont presque identiques dans les deux spectres (référence (Figure 7)). Dans la partie inférieure à 1200 représentée par l'empreinte digitale, les pics sont conformes. Ceci permet de déduire que le spectre du principe actif est conforme à la référence.

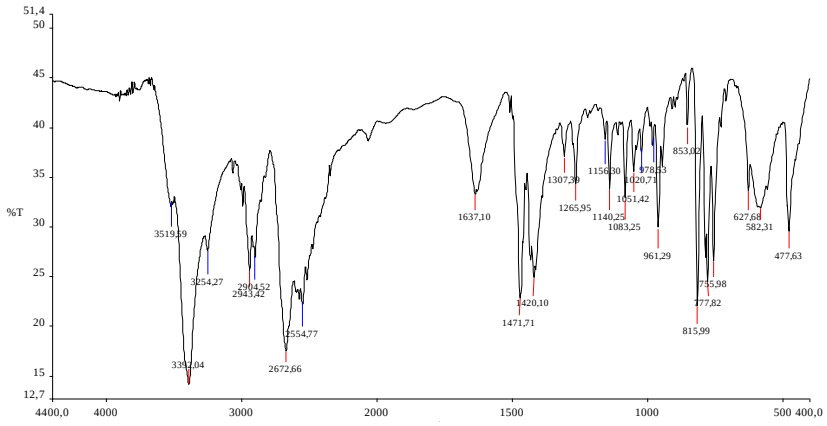


Figure 7 : Spectre référence d'absorption par infrarouge de la Cyproheptadine Chlorhydrate

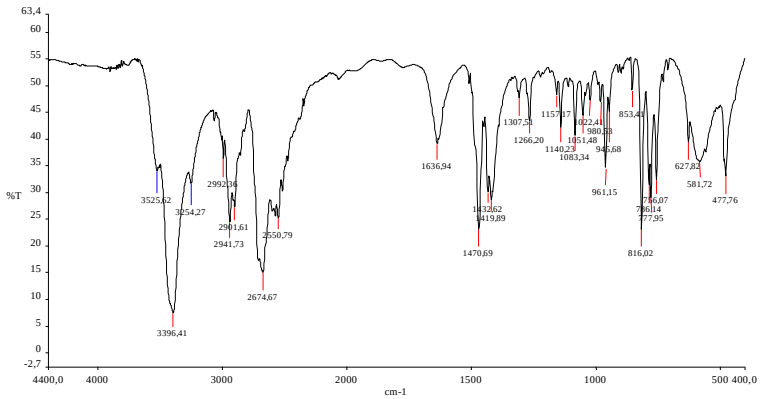


Figure 8 : Spectre d'absorption par infrarouge de l'échantillon Cyproheptadine Chlorhydrate

Pour Coates (2000), le spectre de vibration de la molécule est considéré comme étant une propriété physique unique et caractéristique de la molécule. De ce fait le spectre infrarouge peut être utilisé comme une empreinte digitale pour l'identification de la comparaison du spectre à partir d'un « inconnu » avec des spectres de références enregistrés précédemment.

Les résultats du test de point de fusion des conservateurs antimicrobiens sont conformes aux normes de la Pharmacopée Européenne 2017. Pour Sarker et al. (2013) le point de fusion est la température à laquelle un solide devient un liquide. Le point de fusion est utilisé pour caractériser les composés organiques et pour confirmer la pureté. Le point de fusion d'un composé pur est toujours plus élevé que le point de fusion de ce composé mélangé avec une petite quantité d'impureté. Plus l'impureté est présente, plus le point de fusion est bas.

Le résultat du test de résidu à la calcination pour le principe actif Cyproheptadine Chlorhydrate est conforme selon l'USP 40. Selon Szycher (2012) l'essai du résidu à la calcination est utilisé pour déterminer la teneur en impuretés inorganiques dans une substance organique, ce qui montre que le principe actif est pur et ne contient pas une quantité d'impuretés hors de la norme.

Les résultats du dosage des substances apparentés dans les parabènes sont conformes aux normes de la Pharmacopée Européenne 2017. Pour Chan et al. (2004) les substances apparentées sont des impuretés dérivées de la substance médicamenteuse et comprennent le produit de dégradation, les impuretés synthétiques des substances médicamenteuses et les impuretés du procédé de fabrication provenant du produit pharmaceutique.

III. Résultats du contrôle physicochimique des mélanges semi-finis :

Les résultats du contrôle physicochimique des mélanges semi-finis du Heptagyl 0.04 % ® sont rapportés dans les tableaux suivants :

III.1. Résultats de la densité relative : les résultats de la densité relative des mélanges semi-finis sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Résultats de la densité relative des mélanges semi-finis

Test	Densité Relative
Heptagyl 125 %	**1.189**
Heptagyl 100 %	**1.190**
Heptagyl 75 %	**1.191**
Heptagyl 50 %	**1.185**
Heptagyl Méthyle	**1.188**
Heptagyl Propyl	**1.186**
Heptagyl Placebo	**1.189**
NORMES PE 2017	**1.160 – 1.200**

III.2. Résultats du potentiel d'hydrogène pH :

Les résultats de mesure de pH des mélanges semi-finis sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Résultat des mesures de pH des mélanges semi-finis

Test	pH
Heptagyl 125 %	**4.00 à 23.5 °C**
Heptagyl 100 %	**4.04 à 23.3 °C**
Heptagyl 75 %	**4.02 à 23.5 °C**
Heptagyl 50 %	**4.09 à 23.4 °C**
Heptagyl Méthyle	**4.02 à 23.2 °C**
Heptagyl Propyl	**4.03 à 23.4 °C**
Heptagyl Placebo	**4.02 à 23.6 °C**
NORMES PE 2017	**3.50 – 4.50**

III.3. Résultats du dosage en Cyproheptadine Chlorhydrate et en Parabènes :

Les résultats du dosage en principe actif Cyproheptadine Chlorhydrate et en conservateur antimicrobiens Méthyle Parabène et Propyl Parabène sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Résultats du dosage du principe actif et des parabènes dans les mélanges semi-finis

Dosage	Cyproheptadine Chlorhydrate (%)	Méthyle Parabène g/100 ml	Propyl Parabène g/100ml
Heptagyl 125 %	99.68 %	0.235 g/100 ml	0.022 g/100 ml
Heptagyl 100 %	98.49 %	0.185 g/100 ml	0.018 g/100 ml
Heptagyl 75 %	104.49 %	0.149 g/100 ml	0.016 g/100 ml
Heptagyl 50 %	94.10 %	0.80 g/100 ml	0.010 g/100 ml
Heptagyl Méthyle	96.13 %	0.185 g/100 ml	/
Heptagyl Propyl	104.95 %	/	0.021 g/100 ml
Placebo	104.00 %	/	/
NORMES PE 2017 (100 %)	90.00 % à 110 %	0.162 – 0.198 g/100 ml	0.018 – 0.022 g/100 ml

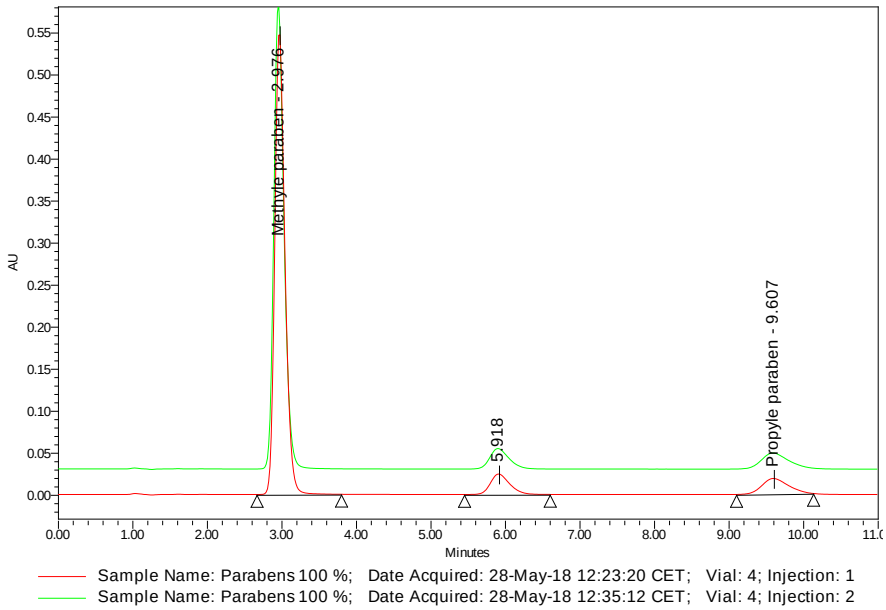
Discussion :

La densité relative des mélanges semi-finis est conforme aux normes de la Pharmacopée Européenne 2017. Pour Fahr (2018) la densité relative est le rapport entre la densité du système d'essai et la densité d'un système de référence dans des conditions qui doivent être définies pour les deux systèmes. La densité relative est principalement rapportée à la densité de l'eau à 20 ° C ou 4 ° C. La densité est une caractéristique importante de la substance qui est utilisée comme preuve de l'identité et de la pureté des médicaments et des additifs, en particulier des liquides.

Les résultats de la mesure du pH sont conformes aux normes de la Pharmacopée Européenne 2017. Pour Geneviève et al. (2001) les phénomènes d'acidité jouent un rôle important dans de nombreuses réactions chimiques ou biologiques, c'est la raison pour laquelle le pH et sa mesure sont considérés comme indispensables lors du contrôle de divers processus. En effet, l'influence des protons se manifeste à des concentrations extrêmement faibles. Le paramètre essentiel à considérer est l'activité du proton en solution.

Le dosage par HPLC des conservateurs antimicobiens et du principe actif des mélanges semi-finis est conforme aux normes de la Pharmacopée Européenne (2017). Selon Siddiqui et al. (2013) la spécificité de la méthode HPLC est excellente, simultanée et d'une précision suffisante. Cependant, il doit être déclaré que la spécificité étonnante, n'est possible que si le système et les tests réalisés en avant montrent l'efficacité de l'HPLC, et c'est pour cette raison que les exigences de coût pour les études de spécificité restent élevées.

Nos résultats montrent une répétabilité des résultats des aires entre les injections et par rapport au temps de rétention, et que l'écart type relatif ou (% RSD) ne dépasse pas les 2,0 % (Figure 7). Pour McPolin (2009) le nombre d'injections à effectuer pour l'opération de répétabilité d'injection est habituellement de six. L'USP exige cinq injections si l'exigence de (% RSD) est inférieure à 2,0 % et six injections si l'exigence pour (% RSD) est supérieure à 2,0%. Dans la Pharmacopée Européenne et la Pharmacopée Japonaise le nombre d'injections est généralement spécifié dans la monographie.



Peak Summary with Statistics
Name: Methyle paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Parabens 100 %	4	1	Methyle paraben	2.976	5196658	85.46	549215
2	Parabens 100 %	4	2	Methyle paraben	2.964	5232803	85.43	553179
Mean					2.970	5214730.5		
Std. Dev.					0.009			
% RSD					0.31	0.5		

Figure 9 : Exemple de répétabilité des injections d'HPLC dans un échantillon

Selon McPolin (2009) la mesure de la répétabilité des injections effectuées lors d'une analyse chromatographique garantit que les performances du système sont cohérentes. La répétabilité est généralement mesurée en calculant l'écart type relatif (% RSD). L'écart-type pour un ensemble de points de données fournit une mesure de la propagation des points de données individuelles. La conversion de cette valeur en un pourcentage de la moyenne de l'ensemble de données permet la comparaison de différents ensembles de données. Ce que cela signifie pour le non statisticien, c'est que l'écart-type n'a de sens que pour les points de données pour n'importe quel ensemble de données. La répétabilité de l'injection est une condition de la précision de l'injection.

Le dosage du principe actif de la Cyproheptadine Chlorhydrate est conforme aux normes de la Pharmacopée Européenne (2017). Pour Petan et al. (2008), une quantité respectée du principe actif dans un médicament garantit un effet thérapeutique fiable.

IV. Contrôle microbiologique des produits semi-finis :

Le contrôle microbiologique des produits semi-finis d'Heptagyl 0.04 % ® avait pour but de vérifier si le sirop ne contient pas de germes pathogènes et que les germes aérobies totaux et levures et moisissures sont en nombre restreint.

Les résultats du contrôle microbiologique sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Résultats du contrôle microbiologique des mélanges semi-finis

	Dénombrement des moisissures et levures (UFC/g)	**Dénombrement des germes aérobies totaux (UFC/g)**	**Recherche d'*Escherichia coli***
Heptagyl 125 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl 100 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl 75 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl 50 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl Methyle	Absence	Absence	Absence
Heptagyl Propyl	Absence	Absence	Absence
Placebo	Absence	Absence	Absence
Normes PE 2014	10^1	10^2	Absence

10^1 : nombre maximal acceptable = 20 ; 10^2 : nombre acceptable maximale = 200

La contamination des matières premières ainsi que l'eau utilisée pour la fabrication de médicaments par voie orale peuvent être associées à des complications inexpliquées liées aux traitements chez les patients. Ainsi, la présence de la microflore contaminante, en particulier en cas de dépassement de la limite acceptable apporte une menace majeure dans les mesures de santé publique (Khanom et al. 2013)

Dans ce cadre les résultats du contrôle microbiologique ont montré une absence totale des germes aérobies totaux, ainsi qu'une absence des levures et moisissures, des entérobactéries et d'*Escherichia coli*, ce qui permet de confirmer la bonne qualité microbiologique et le respect des normes prescrites par la Pharmacopée Européenne (2014).

D'après l'European Medicines Agency (2000), le test microbiologique et l'absence des microorganismes est considéré comme un témoin de bonnes pratiques dans le processus de fabrication et une assurance de qualité.

Selon Gad et al. (2011), un nombre réduit des germes aérobies totaux indique que la qualité microbiologique du produit examiné est suffisante et dans la plupart des cas excellente.

V. Contrôle toxicologique des mélanges semi-finis (test d'innocuité) :

Les résultats du test d'innocuité des mélanges semi-finis d'Heptagyl 0.04 % ® chez les souris sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Résultats du test d'innocuité d'Heptagyl 0.04 % ® chez les souris

	Anomalie chez les 5 souris	**Mortalité chez les 5 souris**
Heptagyl 125 %	Aucune	Aucune
Heptagyl 100 %	Aucune	Aucune
Heptagyl 75 %	Aucune	Aucune
Heptagyl 50 %	Aucune	Aucune
Heptayl Methyle	Aucune	Aucune
Heptagyl Propyl	Aucune	Aucune
Placebo	Aucune	Aucune
Normes Pharmacopée Européenne (2009)	Aucune anomalie ne doit être enregistrée	Aucune mortalité ne doit être enregistrée

Selon Holloway et al. (2005), les problèmes d'innocuité des médicaments sont le plus souvent dus à des erreurs médicamenteuses, à une mauvaise qualité des produits et à la toxicité intrinsèque de certains médicaments.

Dans le cas de notre produit les résultats du test d'innocuité 48 heures après administration par voie orale d'une quantité des mélanges semi-finis d'Heptagyl 0.04 % ® chez des souris montrent qu'il y'a absence d'anomalies et de mortalité chez les 5 souris. Le médicament présente une parfaite innocuité et les résultats sont conformes à la norme de la Pharmacopée Européenne (2009).

Selon la Pharmacopée Européenne (2004), une substance médicamenteuse passe le test d'innocuité si aucune des souris ne meurt dans les 24 h ou dans le délai spécifié dans la monographie.

VI. Résultats de l'étude de stabilité :

VI .1. Résultats de l'étude de stabilité dans les conditions réelles :

VI.1.1. Résultats de la densité relative :

Les résultats de la densité relative des mélanges semi-finis sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 16 : Résultats de la densité relative des mélanges semi-finis dans le réel

Test	Densité Relative
Heptagyl 125 %	**1.182**
Heptagyl 100 %	**1.189**
Heptagyl 75 %	**1.185**
Heptagyl 50 %	**1.185**
Heptagyl Methyle	**1.186**
Heptagyl Propyl	**1.187**
Heptagyl Placebo	**1.183**
NORMES PE 2017	**1.160 – 1.200**

VI.1.2. Résultats du potentiel d'hydrogène pH :

Les résultats de mesure de pH des mélanges semi-finis sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Résultats des mesures de pH des mélanges semi-finis dans le réel

Test	pH
Heptagyl 125 %	**4.06 à 23.5 °C**
Heptagyl 100 %	**4.03 à 23.3 °C**
Heptagyl 75 %	**4.01 à 23.5 °C**
Heptagyl 50 %	**4.00 à 23.4 °C**
Heptagyl Méthyle	**3.99 à 23.2 °C**
Heptagyl Propyl	**4.00 à 23.4 °C**
Heptagyl Placebo	**4.06 à 23.6 °C**
NORMES PE 2017	**3.50 – 4.50**

VI.1.3. Résultats du dosage en Cyproheptadine Chlorhydrate et en Parabènes :

Les résultats du dosage en principe actif Cyproheptadine Chlorhydrate et en conservateurs antimicrobiens Méthyle Parabène et Propyl Parabène sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 18 : Résultats du dosage du principe actif et des parabènes dans les mélanges semi-finis dans le réel

Dosage	Cyproheptadine Chlorhydrate (%)	Méthyle Parabène g/100 ml	Propyl Parabène g/100ml
Heptagyl 125 %	100.01 %	0.238 g/100 ml	0.023 g/100 ml
Heptagyl 100 %	98.60 %	0.184 g/100 ml	0.018 g/100 ml
Heptagyl 75 %	105.02 %	0.145 g/100 ml	0.016 g/100 ml
Heptagyl 50 %	97.30 %	0.79 g/100 ml	0.010 g/100 ml
Heptagyl Méthyle	97.18 %	0.183 g/100 ml	/
Heptagyl Propyl	103.20 %	/	0.020 g/100 ml
Placebo	102.60 %	/	/
NORMES PE 2017	90.00 % à 110 %	0.162 – 0.198 g/100 ml	0.018 – 0.022 g/100 ml

VI.1.4. Résultats du contrôle microbiologique :

Les résultats du contrôle microbiologique sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Résultats du contrôle microbiologique des mélanges semi-finis dans le réel

	Dénombrement des moisissures et levures (UFC/g)	Dénombrement des germes aérobies totaux (UFC/g)	Recherche d'*Escherichia coli*
Heptagyl 125 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl 100 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl 75 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl 50 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl Méthyle	Absence	Absence	Absence
Heptagyl Propyl	Absence	Absence	Absence
Placebo	Absence	Absence	Absence
Normes PE 2014	10^1	10^2	Absence

VI.1.5. Résultats du test de toxicologie :

Les résultats du test de toxicologie sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 20 : Résultats du test d'innocuité d'Heptagyl 0.04 % ® chez les souris dans le réel

	Anomalie chez les 5 souris	Mortalité chez les 5 souris
Heptagyl 125 %	Aucune	Aucune
Heptagyl 100 %	Aucune	Aucune
Heptagyl 75 %	Aucune	Aucune
Heptagyl 50 %	Aucune	Aucune
Heptayl Méthyle	Aucune	Aucune
Heptagyl Propyl	Aucune	Aucune
Placebo	Aucune	Aucune
Normes Pharmacopée Européenne (2009)	Aucune anomalie ne doit être enregistrée	Aucune mortalité ne doit être enregistrée

VI .2. Résultats de l'étude de stabilité dans les conditions accélérées :

VI.2.1. Résultats de la densité relative :

Les résultats de la densité relative des mélanges semi-finis sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 21 : Résultats de la densité relative des mélanges semi-finis dans l'accéléré

Test	Densité Relative
Heptagyl 125 %	**1.185**
Heptagyl 100 %	**1.187**
Heptagyl 75 %	**1.183**
Heptagyl 50 %	**1.184**
Heptagyl Méthyle	**1.190**
Heptagyl Propyl	**1.188**
Heptagyl Placebo	**1.180**
NORMES PE 2017	**1.160 – 1.200**

VI.2.2. Résultats du potentiel d'hydrogène pH :

Les résultats de mesure de pH des mélanges semi-finis sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 22 : Résultats des mesures de pH des mélanges semi-finis dans l'accéléré

Test	pH
Heptagyl 125 %	**4.03 à 23.5 °C**
Heptagyl 100 %	**4.01 à 23.3 °C**
Heptagyl 75 %	**4.08 à 23.5 °C**
Heptagyl 50 %	**4.04 à 23.4 °C**
Heptagyl Méthyle	**4.00 à 23.2 °C**
Heptagyl Propyl	**3.99 à 23.4 °C**
Heptagyl Placebo	**4.01 à 23.6 °C**
NORMES PE 2017	**3.50 – 4.50**

VI.2.3. Résultats du dosage en Cyproheptadine Chlorhydrate et en Parabènes :

Les résultats du dosage en principe actif Cyproheptadine Chlorhydrate et en conservateurs antimicrobiens Méthyle Parabène et Propyl Parabène sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 23 : Résultats du dosage du principe actif et des parabènes dans les mélanges semi-finis dans l'accéléré

Dosage	Cyproheptadine Chlorhydrate (%)	Methyle Parabène g/100 ml	Propyl Parabène g/100ml
Heptagyl 125 %	99.35 %	0.234 g/100 ml	0.023 g/100 ml
Heptagyl 100 %	98.08 %	0.185 g/100 ml	0.018 g/100 ml
Heptagyl 75 %	103.13 %	0.141 g/100 ml	0.016 g/100 ml
Heptagyl 50 %	97.44 %	0.88 g/100 ml	0.010 g/100 ml
Heptagyl Méthyle	99.01 %	0.185 g/100 ml	/
Heptagyl Propyl	101.60 %	/	0.020 g/100 ml
Placebo	103.14 %	/	/
NORMES PE 2017 pour 100 %	90.00 % à 110 %	0.162 – 0.198 g/100 ml	0.018 – 0.022 g/100 ml

VI.2.4. Résultats du contrôle microbiologique :

Les résultats du contrôle microbiologique sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 24 : Résultats du contrôle microbiologique des mélanges semi-finis dans l'accéléré

	Dénombrement des moisissures et levures (UFC/g)	Dénombrement des germes aérobies totaux (UFC/g)	Recherche d'*Escherichia coli*
Heptagyl 125 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl 100 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl 75 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl 50 %	Absence	Absence	Absence
Heptagyl Méthyle	Absence	Absence	Absence
Heptagyl Propyl	Absence	Absence	Absence
Placebo	Absence	Absence	Absence
Normes PE 2014	10^1	10^2	Absence

VI.2.5. Résultats du test de toxicologie :

Les résultats du test de toxicologie sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 25 : Résultats du test d'innocuité d'Heptagyl 0.04 % ® chez les souris dans l'accéléré

	Anomalie chez les 5 souris	Mortalité chez les 5 souris
Heptagyl 125 %	Aucune	Aucune
Heptagyl 100 %	Aucune	Aucune
Heptagyl 75 %	Aucune	Aucune
Heptagyl 50 %	Aucune	Aucune
Heptayl Méthyle	Aucune	Aucune
Heptagyl Propyl	Aucune	Aucune
Placebo	Aucune	Aucune
Normes Pharmacopée Européenne (2009)	Aucune anomalie ne doit être enregistrée	Aucune mortalité ne doit être enregistrée

Les résultats de l'étude de stabilité dans les conditions réelles et accélérées ont montré une conformité des mélanges aux normes de la Pharmacopée Européenne. Le dosage des parabènes à différentes concentrations n'a pas subi une dégradation et a donné des

résultats conformes. Le contrôle microbiologique et toxicologique montre une innocuité du produit et une absence du germe pathogène *Escherichia coli* ainsi que les levures et moisissures, ce qui montre que le produit ne présente aucun danger pour la santé du consommateur.

Pour Yoshioka et al. (2007) la dégradation chimique et la dégradation physique des substances médicamenteuses peuvent modifier leurs effets pharmacologiques, entraînant une altération de l'efficacité thérapeutique ainsi que des conséquences toxicologiques. Parce que les produits pharmaceutiques sont utilisés en thérapeutique en fonction de leur efficacité et de leur innocuité, ils doivent être stables et conserver leur qualité jusqu'au moment de l'utilisation ou jusqu'à leur date d'expiration. La qualité doit être maintenue dans les diverses conditions rencontrées par les pharmacologues, pendant la production, le stockage dans les entrepôts, le transport et le stockage dans les pharmacies hospitalières et communautaires, ainsi qu'à la maison.

Selon Aurebach (2011) les principaux facteurs environnementaux affectant la stabilité du médicament sont la température, l'humidité et la lumière. De plus, on pense que les conservateurs inclus dans un médicament améliorent ou, dans certaines conditions, diminuent son efficacité d'un médicament au cas d'un stockage à long terme. Une température et une lumière élevées peuvent provoquer la décomposition spontanée, la reconstitution ou la réaction spontanée de médicaments avec de l'air ou des substances qui, par contamination, se sont mélangées aux ingrédients inactifs. L'exposition à une humidité élevée peut réduire le taux de dissolution d'un médicament, ce qui constitue un risque pour la biodisponibilité des médicaments pris par la bouche. Connaître le taux anticipé de dégradation des médicaments est essentiel pour savoir comment titrer le bon dosage pendant des périodes prolongées sur le terrain et comment connaître la fréquence de réapprovisionnement en médicaments.

Yoshioka et al. (2007) expliquent qu'une photodégradation a été rapportée pour un grand nombre de substances médicamenteuses. Les mécanismes de ces réactions sont généralement très complexes.

Les médicaments sont rarement formulés comme étant simplement la substance médicamenteuse elle-même. Souvent, des additifs ou des excipients sont présents dans les formulations. Très souvent, une réaction peut se produire entre le médicament et un ou

plusieurs additifs. De même, deux médicaments peuvent être formulés dans le même produit et réagir l'un avec l'autre (Yoshioka et al. 2007).

Selon Jain et al. (2013) pour s'assurer que le patient reçoit la dose correcte d'un médicament, le taux de dégradation doit être connu quelle que soit la forme dans laquelle il est administré (solution, suspension, comprimés et gélules).

Pour Yoshioka et al. (2007) le médicament peut se dégrader en une substance toxique. Par conséquent, il est important de déterminer non seulement combien le médicament s'est dégradé avec le temps mais aussi quels sont les produits imputables à sa dégradation.

Nos résultats montrent que les mélanges sont conformes, ce qui explique que le principe actif ainsi que les conservateurs utilisés sont de bonne qualité. Les parabènes ne se sont pas dégradés après un mois de préparation et n'ont pas occasionné d'altération de la Cyproheptadine Chlorhydrate.

Conclusion

Conclusion :

Nous nous sommes intéressés dans la présente étude d'une part aux contrôles du principe actif et des conservateurs antimicrobiens et une mise au point galénique d'un antihistaminique Heptagyl 0.04 % ® ; et d'autre part à l'étude de la stabilité des conservateurs antimicrobiens dans des conditions réelles et dans des conditions accélérées. Les résultats obtenus ont montré ce qui suit :

- **Concernant le principe actif : la Cyproheptadine Chlorhydrate**

- L'identification par spectrophotométrie d'absorption en infrarouge a révélé des pics identiques dans les deux spectres (référence et essai), ce qui signifie que la composition moléculaire dans les deux échantillons est identique.
- L'analyse physicochimique qui consistait à déterminer l'aspect de la solution, a révélé une solution limpide et incolore conforme à la norme. La teneur en eau a donnée une valeur conforme à la norme. La quantité des résidus à la calcination présente dans la Cyproheptadine Chlorhydrate est inférieure à 0,1 % ce qui confirme sa pureté.

- **Concernant les conservateurs antimicrobiens : Parahydroxybenzoate de Méthyle et Parahydroxybenzoate de Propyl :**

- L'identification par spectrophotométrie d'absorption en infrarouge a révélé des pics identiques dans les deux spectres (référence et essai) du Parahydroxybenzoate de Méthyle et de Propyl, ce qui signifie que la composition moléculaire dans les deux échantillons est identique.
- L'analyse physicochimique qui consistait à déterminer l'aspect de la solution dans les deux conservateurs, a révélé une solution limpide et incolore conforme à la norme. La quantité des cendres sulfuriques présentent dans le Parahydroxybenzoate de Méthyle et de Propyl était inférieure à 0,1 % confirme sa pureté.

- **Concernant les mélanges semi-finis : Heptagyl 0.04 % ® :**

- L'ensemble des résultats de la mesure de pH et de densité montrent le respect des bonnes pratiques de fabrication (BPF) durant l'étape de préparation galénique du sirop.
- Le dosage du principe actif dans la Cyproheptadine Chlorhydrate par chromatographie liquide à haute performance a donné des valeurs conformes pour chaque mélange, ces valeurs se situent dans l'intervalle des normes exigées par la pharmacopée européenne (2017), ce en qui garantit un effet pharmacologique et donc thérapeutique fiable.
- Le dosage des conservateurs antimicrobiens a donné des résultats théoriques pour chaque préparation, l'objectif était de varier les concentrations pour pouvoir étudier la stabilité ou la dégradation des conservateurs antimicrobiens après un mois.
- Quant au contrôle microbiologique des mélanges semi-finis : Heptagyl 0.04 % ®, les résultats ont montré une absence totale des germes viables totaux, des levures et moisissures et d'*Escherichia coli*. Cela est dû à la bonne qualité microbiologique des matières premières et à l'application stricte des règles d'hygiène durant la préparation galénique.
- Les mélanges semi-finis d'Heptagyl 0.04 % ne présentent aucune toxicité. Cela a été démontré par un contrôle toxicologique (test d'innocuité) sur des souris. Le médicament présente une parfaite innocuité et les résultats sont conformes à la norme de la Pharmacopée Européenne (2009).

- **L'étude de la stabilité *in vitro* :**

L'étude de la stabilité *in vitro* a permis de déduire une stabilité pharmaceutique des mélanges semi-finis. Le dosage par HPLC des conservateurs antimicrobiens et du principe actif a donné des résultats qui montrent qu'il n'y a pas eu de dégradation du principe actif ni des conservateurs antimicrobiens et ce aux différentes concentrations.

Perspectives :

Il serait intéressent d'envisager une suite à cette étude de stabilité *in vitro* sur une période plus longue et dans les conditions réelles et accélérées et faire le Challenge Test pour

vérifier l'efficacité de ces conservateurs antimicrobiens dans les différentes concentrations qu'on a utilisées. Il serait également intéressant d'étudier la toxicité des conservateurs antimicrobiens : Parahydroxybenzoate de Méthyle et Parahydroxybenzoate de Propyl *in vivo* et ceci aux différentes concentrations, essentiellement les parahydroxybenzoates qui font d'ailleurs partie de l'actualité notamment par rapport à leurs effets néfastes sur la santé du consommateur.

Références Bibliographique

Allain P., 2000, Les médicaments 3éme édition, édition CdM, 438p

Allo Olivier., Pascale Blanc., Marie-Ange Dalmasso,. 2005 Pharmacie Galénique BP 2ème édition, 130p

ANSM., 2012, Les médicaments génériques : des médicaments à part entière : cadre réglementaire du médicament générique, 14p

Aurebach Paul S., 2011, Wilderness Medicine sixth edition, Elsevier Health sciences Edition, 2304p

Barbara H., Stuart., David J., Ando, 1997, Biological applications of infrared spectroscopy, édition John Wiley & Sons, 191p

Bergmann K.-C., J. Ring., 2014, History of Allergy, Karger Medical and Scientific Publishers, 446p

Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G., Verne-Bourdais E., 2002, Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires, 245p

Bonnes Pratique de Fabrication., 2014, Agence Nationale de Sécurité du Médicament et Des Produits de Santé, Bulletin Officiel N° 2014/1bis, 284p

Bustany P, P-D Chaumet-Riffaud, Philippe Chaumet-Riffaud., 1993, Editions Beauchesene, 282p

Caro Denise., Slama Rémy., 2017, Les perturbateurs endocriniens : Comment affectent-ils notre santé au quotidien ?, Edition QUAE GIE, 240p

Caughey Aaron B., 2004, Blueprints Notes and Cases Pharmacology, Lippincott Williams & Wilkins, 187p

Chan Chung Chow., Y. C. Lee & Herman Lam., Xue-Ming Zhang., 2004, Analaytical Method Validation and Instrument Performance Verification John Wiley & Sons Edition, 320p

Chhajer Bimal., 2016, Allergy, Symptoms Causes and Mechanism Measures to Treatements, Diamond Pocket Books Pvt Ltd, 140p

Chiaradia-Bousquet J-P., 1994, Régime juridique du contrôle et de la certification de la qualité des denrées alimentaires : puissance publique et producteurs, édition Food and Agriculture Org, 132p

Coates J., 2000, Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, édition John Wiley & Sons Ltd, 23p

Cohen Yves, Christian Jacquot., 2008, Abrégés pharmacologie 6ème édition, Elsevier Masson, 512p

Denyer P.S., Hodges N., Gorman P.S., Gilmore B, 2011, Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiolgy 8th Edition, édition Wiley-Blackwell, 513p

Depecker L., 2002, Entre signe et concept : éléments de terminologie générale, édition Presses Sorbonne Nouvelle, 198p

Durand G., 2010, Potentiométrie : Dosages et titrages, Caractéristiques analytiques, 2p

Eliott T., Casey A., Lambert P., Sandoe J., 2011, Medical Microbiology and Infection 5th Edition, édition Wiley-Blackwell, 320p

European Pharmacopoeia 6th Edition, 2007, Council of Europe, 3308p

European Pharmacopoeia 5th Edition, 2004, Council of Europe, 2727p

European Medicines Agency, 2000, Note for guidance specification : test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products : chemical substances, 32p

Fahr Alfred., 2018, Voigt's Pharmaceutical Technology, John Wiley & Sons Edition, 888p

FAO., 2007, Les bonnes pratiques d'hygiène dans la préparation et la vente des aliments de rue en Afrique : Outils pour la formation, Food & Agriculture Org FAO, 175p

Gad G.F.M., Aly R.A.I., Ashour M.S.E., 2011, Microbial evaluation of some non sterile pharmaceutical preparations commonly used in the egyptian market, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 437-445p

Gazengel Jean-Marie., Orecchioni Anne-Marie., 2013, Le préparateur en pharmacie : guide théorique et pratique 2ème édition, Edition Levoisier, 1761p

Geneviève M.L.Dumas., Roger I. Ben-Aim., 2001, Edition Isabelle Lis, L'indispensable en Eletrochilie, 104p

Guedj Marcel., 2010, Une maison saine et sans allergie : des solutions pour chaque pièce, Fleurus, 128p

Harvey P.W., Everett D., 2004, Significance of the detection of esters ofp-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours, Journal of Applied Toxicology, 1 – 4p

Holloway K., Green T., 2005, OMS Département Médicaments essentiels et politiques pharmaceutiques Genève, Suisse En collaboration avec Management Sciences for Health Center for Pharmaceutical Management Rational Pharmaceutical Management Program Arlington, Virginia, Etats-Unis d'Amérique, Les comités pharmaceutiques et thérapeutiques guide pratique, 152p

Jain Gaurav., Roop Krishen Khar & Farhan Jalees Ahmad., 2013, Theory and Practice of Physical Pharmacy, Elsevier Health Sciences Edition, 420p

Khanom S., Kanta Das K., Banik S., Noor R., 2013, Microbiological analysis of liquid oral drugs available in Bangladesh, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 479-482p

Kirkiacharian S., 2010, Guide de chimie médicinale et médicaments, édition Lavoisier, 900p

Knowlton J., Peance S., 1993, Handbook of Cosmetic Science and Technology, Edition Elsevier Advansed Technology, 581p

Kotz John C., Triechel Jr Paul M,. 2006, Chimie Générale, Edition De Boeck Supérieur, 432p

Lechat P., 2006, Pharmacologie, Université Pierre et Marie Curie, Niveau DCEM1, 349p

Le Coz Christophe., 2010, Progrès en dermato-allergologie 2010 Strasbourg, Editeur John Libbey Eurotext, 372p

Lespagnol A., 1979, Chimie des médicaments Tome 1, Entreprise Moderne d'édition, 440p

Le Hir A., Chameil J-C., Brossard D., 2011, Pharmacie galénique : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments 9éme édition, édition Elsevier Masson, 382p

Martini M.C., Seiller M., 1999, Actifs et additifs en cosmétologie, Ed Technique et documentation Lavoisier, Paris 2ème édition, 431p

McPolin O., 2009, An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis, édition Mourne Training Services, 139p

Mesplède Jacques., Christine Saluzzo., 2004, 100 manipulations de chimie : Organique et inorganique, Bréal Edition, 287p

Michel Olivier., 2017, Tous allergique : comprendre une épidémie contemporaine, Edition Mardaga, 188p

Molina Claude., 1997, L'allergie à l'aube du troisième millénaire, John Libbey Eurotext, 204p

Mulberry G.K., Entrup M.R., Agin J.R., 1987, Cosmetics and Toiletries, Hill Top biolabs Inc., Cincinnati, 102p

Nafti Salim., Samya Taright., Mustapha El Ftouh., Najiba Yassine., Ali Benkhedar., Hend Bouacha., Hachemi Fakhfakh., Moufida Ali-Khoudja., Nathalie Taxier., Abdelkader El Hasnaoui., 2009, Prevalence of asthma in North Africa : the Asthma Insights and Reality in the Maghreb (AIRMAG) study, Elsevier, 2 – 11p

Owen A Judith., Jenni Punt., 2013, Kuby Immunology 7th edition, Macmilan Learning Edition, 692p

Patrick G.L., 2003, Chimie pharmaceutiques 2éme édition traduction par Depovere P, édition De Boeck, 629p

Petan J.A., Undre N., First M.R., Saito K., Ohara T., Iwabe O., Mimura H., Suzuki M., Kitamura S., 2008, Physiochemical properties of generic formulations of Tacrolimus in Mexico, Elsevier, 1439-1442p

Pradeau D., 1992, Analyse pratique du médicament, édition EM Inter, 1068p

Robert Jacques., 2012, Vivre mieux avec les allergies de l'enfant, Odile Jacob édition, 240p

Sarker Satyajit., Lutfun Nahar., 2013, Chemistry for the Pharmacy Students : General, Organic ans Natural Product Chemistry, Edition John Wiley & Sons, 400p

Sherwood L.M., Wiley J.M., Woolverton C.J., 2010, Microbiologie 3éme édition, édition De Boeck, 1216p

Siddiqui Massom Raza., Zeid A AlOthman., Nafisur Rahman., 2013, Analytical technique in pharmaceutical analysis : A review, Arabian Journal Of Chemistry, King Saud University, 1409 – 1421p

Skoog A Douglas., Holler F James., Nieman A Timothy., Claudine Buess Herman., Freddy Dumont., 2003, Principes d'analyse instrumentale, Edition De Boeck, 956p

Solabia, 2013, Gélose Trypto-Caseine Soja (TSA), Biokar diagnostics, 4p

Solabia, 2010, Gélose de SABOURAUD au chloramphénicol, Biokar diagnostics, 2p

Soni M.G, Carabin I.G, G.A. Burdock., 2005, Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens), Elsevier, 985 – 1015p

Stora Denis., 2005, Pharmacologie : Cahier du préparateur 3ème édition, Collection Porphyre, 382p

Stora Denis., 2013, Pharmacologie et thérapeutique : validation des UE 2ème édition, Editeur Lamarre, 324p

Szycher Michael., 2012, Szycher's Handbook of Polyurethanes, Second Edition, CRC Press, 1144p

Talbert M., Willoquet G., Gervais R., 2009, Le guide pharmaco clinique, édition Wolters Kluwer France, 1063p

Tay Kheng Soo, Noorsaadah Abd Rahman, Mhd Radzi Bin Abas., 2010, Ozonation of parabens in aqueous solution : Kinetics and mechanism of degradation, Elsevier Chemosphere, 1446 – 1453p

Thorsteinn Loftsson., 2014, Drug Stability for Pharmaceutical Scientists, Academic Press Edition, 170p

Vandamme T.F., Rival Y., Pabst J-Y., Heitz C., 2010, Initiation à la connaissance du médicament, édition EM INTER, 337p

Vidal, 2012, Dictionnaire médical à usage humain, 88éme édition, édition Vidal, 3000p

Wichtl M., Anton T., 2003, Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, édition Tec et Doc et EM Inter, 692p

Yoshioka Sumie., Valentino J. Stella., 2007, Stability of durgs and dosage forms, 270p

Annexes

Annexes

Verrerie et autres :

- Eprouvettes
- Fioles jaugées
- Papier filtre
- Papier Josèphe
- Filtres sous vide
- Béchers
- Pipettes graduées
- Pissette
- Erlenmeyer
- Entonnoir
- Spatule en métal
- Seringue en plastique de 5 ml
- Flacons en verre brun
- Barreau magnétique
- Gants
- Mortier et pilon
- Propipette
- Sonde de gavage
- Boites de pétri
- Cages pour souris

Annexe 01

Réactifs et solutions :

- Acide orthophosphorique
- Acétonitrile (HPLC)
- Méthanol
- Eau distillée
- Acide chlorohydrique
- Phosphate de potassium monobasique
- Hydroxyde de sodium
- Acide sulfurique
- Ethanol 96 %
- Acétone
- Acide acétique glacial
- Ether
- Chloroforme
- Solution de vert de bromocrésol
- Acide méthane sulfonique
- Isopropanol
- Triéthylamine

Appareillage :

- Appareil de chromatographie en phase liquide à haute performance
- Spectrophotomètre UV
- Spectrophotomètre infrarouge
- Presse hydraulique manuelle
- Four à moufle
- Agitateur magnétique
- Balance de précision
- pH mètre
- Dessiccateur
- Bain Ultrason
- Thermomètre
- Hotte
- Etuve
- Potentiomètre et Karl Fisher

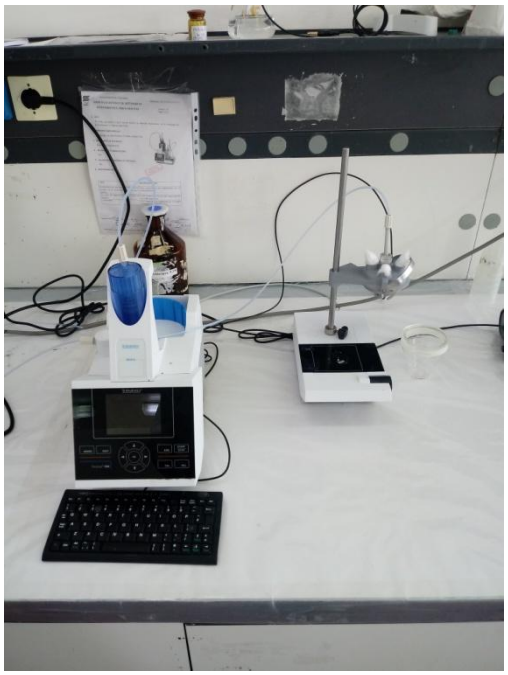


Figure 01 :

Potentiomètre et Karl Fisher TL-7000 SI

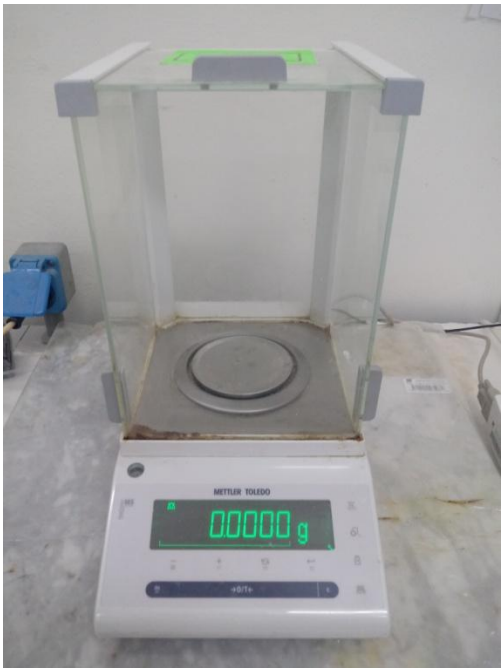


Figure 02 :

Balance Metler Toledo



Figure 03 :

Spectrophotomètre UV-ViS Perkin Elmer



Figure 04 :

HPLC Waters



Figure 05 :

Bain ultra-son Fisher



Figure 06 :

Etuve sous vide Memmert



Figure 07 :

Agitateur et plaque chauffante

VELP Scientifica



Figure 08 :

Hote Exosafe



Figure 09 :

Autoclave



Figure 10 :

Spectrophotomètre infrarouge

Préparations des milieux de culture :

Milieu sabouraud dextrosé-gélosé :

Dextrose	40.0 g
Peptone pancréatique et peptique (1 :1)	10.0 g
Gélose	15.0 g
Eau purifiée	1000 ml

Ajuster le pH pour qu'il soit de 5.6 ± 0.2 à 25 °C après stérilisation.

Stériliser à l'auto clave à 121 °C pendant 20 minutes.

Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja :

Peptone pancréatique de caséine	15.0 g
Peptone papaique de soja	5.0 g
Chlorure de sodium	15.0 g
Gélose	15.0 g
Eau purifiée	1000 ml

Ajuster le pH pour qu'il soit de 7.3 ± 0.2 à 25 °C après stérilisation.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.

Solution tampon peptonée au chlorure de sodium :

Phosphate monobasique	3.6 g
Phosphate disodique dihydraté	7.2 g
Chlorure de sodium	4.3 g
Peptone de viande ou de caséine	1.0 g
Eau purifiée	1000 ml

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes

Annexe 02

Milieu liquide MacConkey :

Hydrolysat pancréatique de gélatine	20.0 g
Lactose monohysraté	10.0 g
Huile de bœuf déhydratée	5.0 g
Pourpre de bromocrésol	10 mg
Eau purifiée	1000 ml

Ajuster le pH qu'il soit de 7.3 ± 0.2 à 25 °C après stérilisation.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes

Milieu gélosé de MacConkey :

Hydrolysat pancréatique de gélatine	17.0 g
Peptones de viande de caséine	3.0 g
Lactose monohydraté	10.0 g
Chlorure de Sodium	5.0 g
Sels biliaires	1.5 g
Gélose	13.5 g
Rouge neutre	30.0 mg
Violet Cristalisé	1 mg
Eau purifiée	1000 ml

Ajuster le pH pour qu'il soit de 7.1 ± 0.2 à 25 °C après stérilisation.

Portez à ébullition pendant 1 min en agitant constamment.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.



Figure 11 :

Gélose liquide MacConkey

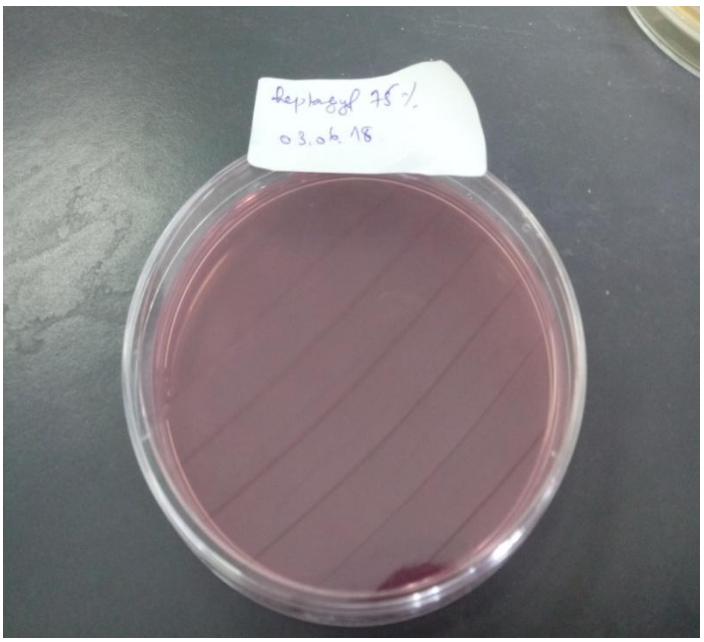


Figure 12 :

Milieu gélosé MacConkey

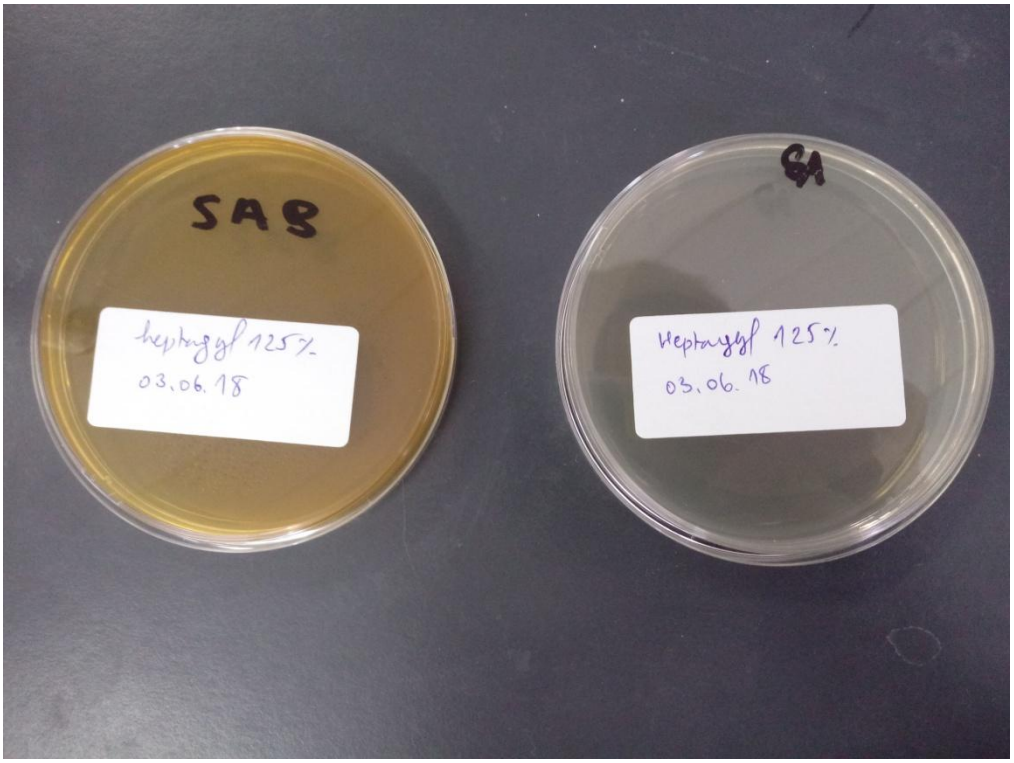


Figure 13 :

Milieu sabouraud dextrosé gélosé et milieu aux pepsines caséine de soja

بسم الله الرحمن الرحيم



صدق الله العظيم

إن أصبت فمن الله وإن أخطأت فمن نفسي والشيطان