

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Biologie

Spécialité : Ecotoxicologie Animale

Intitulé :

**Détermination quantitative d'une série de macrolides
en différents milieux (pharmaceutique et biologique).**

Présenté Par :

**NEKIKECHE LOUBNA - KHELFA YOUSRA - KAHOUL MAROUA -
BOUIARES AMIRA**

Membre de Jury :

Membre de Jury			Univ
Dr. SOUILAH Nabila	(MCA)	Présidente	Du 20 Août 1955 - Skikda
Dr. MAHMOUDI Abdelghani	(MCA)	Directeur de mémoire	Du 20 Août 1955-Skikda
Dr. MELLAHI Lamia	(MCA)	Examinatrice	Du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers ALLAH le Tout-Puissant et miséricordieux pour nous avoir accordé la force et la patience nécessaire pour mener à bien ce modeste travail.

Nous adressons des remerciements particuliers à Dr. Abdelghani MAHMOUDI qui a accepté de nous encadrer et sans lui ce modeste travail n'aurait jamais vu le jour, ainsi pour son soutien et ses encouragements tout au long de ce projet.

Aussi, Nous exprimons évidemment nos sincères remerciements à l'ensemble de membres de jury : Dr. Nabila SOUILAH et Dr. Lamia MELLAHI, pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Nos remerciements vont tout d'abord aux membres du laboratoire de biologie, salle 212, de l'université de Skikda, ainsi que Dr. Sabrina BOUCETTA, pour leurs précieux aide et conseils pratiques.

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé à notre encadrement et tous ceux qui, de près ou de loin nous ont soutenu pour réaliser ce projet dans les meilleures conditions.

Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde, source de vie.

Mes très chers parents :

Ibrahim/Nadira

À mes très chers grands-parents :

Hocine, Barkahem, Hafida.

À ma chère sœur unique : *Aya*

À mes chers frères : *NasrEddine, CharafEddine, Badis et Mahmoud*

À mon cher fiancé : *Bekari Talal et* tout sa famille

À ma chère tante *Wassila*

À tout la famille *Kahoul et Baghloulsans* exceptions

À mes chères amies : *Donia, Fatima, Yousra, Ihsen, Dalal, Aicha, Khawla,*

Juhaina

À mes chères collègues : *Loubna, Yousra, Amira*

À toute seule et ceux qui m'ont aidé et soutenu merci.

Maroua

Je dédie du profond de mon cœur ce mémoire :

À mon cher père *Hamid*,

Merci papa non seulement je te dirai merci pour ce que tu m'as donné, mais merci d'être mon père, que Dieu te bénisse à jamais et de vêtisse de sa piété, peu importe ce que vous vous avez dit sur votre gentillesse et peu importe combien vous avez dit pour vous remercier bien sûr je ne remplirai pas votre droit.

À ma chère mère *Mahbouba*

Votre amour pour moi, pour les sacrifices que vous faites pour moi pour me rendre si heureux et votre labeur pour mon bien-être et mon succès, recevez ceci comme un gage de ma gratitude envers vous et que Dieu vous garde longtemps pour moi et mes frères pour que vous gouttiez, Les arbres plantés par ma belle-mère

À mes belles sœurs *NourHouda Faïza et chahrazad*

je leur témoigne qu'elles sont les meilleurs compagnons en toutes choses

À mes petits frères *Yasser* et *Moussa*, à mon ange Le petit *Acil*, mon beau neveu

À mes meilleurs amies *Chaïma et Loubna*

Vous êtes mon soutien grâce à vous je tiens cette belle position merci
Et mes chers collègues de ce modeste travail

Et tous mes amis qui m'ont soutenu d'une manière ou d'autre.

À tout membre de ma famille

Tout ce qui m'aime et que j'aime

Amira

Je Dédie Ce modeste travail

À mon très cher papa qui a été toujours un exemple pour moi par ses qualités humaines, son honnêteté et sa responsabilité, sois fier de moi aujourd'hui.

À ma chère mère ma douce et tendre maman, je ne pourrai te rendre ce que tu as fait pour moi si je suis arrivé là c'est bien grâce à toi qu'Allah te donne longue vie et te protège pour moi.

À mes très chers frères Housseem et *Islam*

À mes sœurs *Hiba Loubna Amina Lamia Marwa Naïma etkhouloud*

À toute ma famille son exception

Pour mes très chers amies *Amina Loubna Imane Khaoula et chaima*

Mes chers collègues à ce modeste travail

Yousra

Je Dédie Ce modeste travail

À l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

Mon père, tu es tout pour moi. ❤️

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ;

Ma mère, tu es mon roc et mon inspiration. ❤️

À mon bras droit, qui m'a énormément aidée et pour ses sacrifices
Tout au long de ma formation, mon cher trésor

Mon frère Nadjib, merci d'avoir toujours été là pour moi. ❤️

À celles qui m'ont toujours aidée, écoutée, soutenue et encouragée tout au long de mon parcours ; celles qui ont toujours été présentes pour moi,

Mes belles-sœurs Fairouz, Sabrina et Zina, merci pour votre soutien et votre amour inconditionnel. ❤️

À Mes chères ; Ma grande mère, Mes chères tantes, Tedjeddine, Céline

À Mes chérés amies ; Selma et Amira ❤️

À Mes chers collègues de ce modeste travail. Et à toute la famille **Nekikeche** et **Sissaoui**, merci d'avoir fait partie de ma vie et pour votre amour et soutien constants



Loubna

Table des Matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abbreviations	
Introduction Générale	1
Chapitre I : Généralité sur les antibiotiques et les médicaments	
I.1. Introduction.....	4
I.2. Définition des antibiotiques	4
I.3. Rôle des antibiotiques	4
I.4. Classification des antibiotiques	4
I.4.1. Principales familles des antibiotiques	5
I.5. Les macrolides	5
I.5.1. Propriété physicochimiques des macrolides	6
I.5.1.1. Propriété physique.....	6
I.5.1.2. Propriété chimique	6
I.5.2. Structure et classification	6
I.5.2.1. Structure.....	6
I.5.2.2. Classification	7
I.6. Erythromycine	7
I.6.1. Propriétés physico-chimiques.....	7
I.6.2. Indication	7
I.7. Spiramycine	8
I.7.1. Propriétés physicochimiques	8
I.7.2. Utilisations	8
I.8. Généralité sur les médicaments (Erybesan® et Rovamyne®)	8
I.8.1. Définitions de médicament	8
I.8.2. Origine de médicament	9
I.8.2.1. Origine végétale	9
I.8.2.2. Origine animale	9
I.8.2.3. Origine microbiologique	9
I.8.2.4. Origine minéral.....	9
I.8.2.5. Origine synthétique	9
I.8.2.6. Origine biotechnologique	9
I.9. Compositions et conditions des médicaments	9
I.10. Cycle de vie du médicament.....	10
I.11. Dénomination des médicaments.....	10
I.12. Erythromycine :	11

I.13. Erybesan® 200mg/5mL (Sandoz, Spa).....	12
I.14. Rovamyne ®3 MUI (Hupp, Srl).....	12
Chapitre II : Aperçu sur les méthodes physico-chimique d'analyse	
II.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	15
II.1.1. Chromatographie.....	15
II.1.2. Principe.....	15
II.1.3. Classification des méthodes chromatographique.....	15
II.1.3.1. Classification selon la nature des phases.....	16
II.1. 3.2. Classification selon la nature des phénomènes.....	16
II.1.4. Chromatographie liquide à haute performance.....	16
II.1.4.1. Définition.....	16
II.1.4.2. Principe de HPLC.....	17
II.1.4.3. Appareillage.....	17
II.1.4.4. Intérêt de la HPLC dans le contrôle qualité.....	17
II.1.4.5. Avantages de la chromatographie liquide à haute performance.....	18
II.2. Spectrophotométrie UV-Visible.....	18
II.2.1. Définition.....	18
II.2.2. Principe de la spectrophotométrie UV-visible.....	18
II.2.2.1. Loi de Beer-Lambert.....	19
II.2.3. Appareillage.....	19
II.2.4. Conditions d'utilisation d'un solvant en UV visible.....	23
II.2.5. Applications.....	23
II.2.5.a. Analyses qualitatives.....	23
II.2.5.b. Analyses quantitatives.....	23
II.2.6. Principes d'étalonnage avec spectrophotométrie.....	23
Chapitre III : Dosage d'érythromycine et de la spiramycine par une méthode spectrophotométrique d'UV	
III. Introduction.....	26
III.1. Matériel.....	26
III.1.1. Appareillage.....	26
III.1.2. Produits chimiques.....	26
III.2. Méthode expérimentale.....	27
III.2.1. Préparation des solutions.....	27
III.2.2. Préparation du réactif NQ.....	27
III.2.3. Procédure de dérivation chimique.....	27
III.2.4. Optimisation de conditions expérimentales.....	28
III.2.5. Application de la méthode d'analyse.....	28
III.3. Résultats et discussion.....	28

III.3.1. Détermination de la longueur d'onde maximale	28
III.3.2. Optimisation de conditions de la dérivation chimique	29
III.4. Conclusion.....	38
Chapitre IV : Dosage d'érythromycine et de la spiramycine par une méthode biologique	
IV.1. Matériels et méthodes.....	40
A- Etude en milieu pharmaceutique	40
IV.1.1. Appareillage de HPLC	40
IV.1.2. Autres matériels.....	41
a) Dispositif de filtration.....	41
IV.1.3. Solvants et produits chimiques	41
IV.1.4. Protocole générale d'analyse	43
B- Etude en milieu biologique	44
IV.1.5 Matériels et produit chimique.....	44
IV.1.6. Echantillons biologique.....	45
IV.1.7. Préparation et extractions des échantillons	46
IV.2. Résultats et discussion.....	46
A- Etude en milieu pharmaceutique	46
IV.2.1. Optimisation de conditions chromatographiques	46
IV.2.2. Courbes d'étalonnages	49
IV.2.3. Application au dosage pharmaceutique	51
B- Etude en milieu biologique	51
IV.2.4. Méthode d'analyse	51
IV.2.5. Application au dosage biologique	52
IV.3. Conclusion	53
Conclusion Générale.....	55
Références bibliographiques	
Annexes	
Resumé	

Liste des figures

Figure I.1	Structure d'Érythromycine.....	6
Figure I.2	Structure de Spiramycine	6
Figure I.3	Cycle de vie de médicament	10
Figure I.4	Emballage d'Erybesan®200mg/5	12
Figure I.5	Emballage de Rovamyne® 3 M.U.I	13
Figure II.1	Chromatographie aspects généraux [31].....	15
Figure II.2	Schéma de système chromatographique.	17
Figure II.3	Schéma de principe d'un spectrophotomètre.	20
Figure II. 4	Schéma Monochromateur à réseau.....	21
Figure II.5	Une Photodiode.	22
Figure II.6	Une diode.....	22
Figure II.7	Schéma Photomultiplicateur	23
Figure III.1	Spectres d'absorption en UV des complexes Macrolide-NQ.	29
Figure III.2	Influence de la nature du solvant sur l'absorbance de PA-NQ.	30
Figur III.3	Effet de la concentration du réactif (volumes NQ) sur l'absorbance de complexe PA-NQ.....	31
Figure III.4	Influence du milieu alcalin (volumes de NaOH) sur l'absorbance des complexes (ERY-NQ et SPI-NQ).....	32
Figure III.5	Influence du temps de réaction sur l'absorbance des complexes PA- NQ.....	33
Figure III.6	Influence de la température sur l'absorbance du complexe PA-NQ.	34
Figure III.7	Courbes d'étalonnages du détecteur en milieu aqueux (A : érythromycine et B : spiramycine).	36
Figure IV.1	Chromatogramme obtenu avec le standard d'érythromycine à une longueur d'onde de 215 nm.	47
Figure IV.2	Chromatogramme obtenu avec le standard de spiramycine à une longueur d'onde de 232 nm.	48
Figure IV.3	Courbe d'étalonnage du détecteur pour l'érythromycine.....	50
Figure IV.4	Courbe d'étalonnage du détecteur pour la spiramycine.	50

Liste des Tableaux

Tableau I.1 Propriétés chimiques et physiques de spiramycine.....	8
Tableau I.2 Information sur Erybesan®.....	12
Tableau I.3 Information sur Rovamyne®.....	13
Tableau III.1 Influence de la nature du solvant sur l'absorbance de PA-NQ.....	29
Tableau III.2 Effet de la concentration du NQ sur l'absorbance des complexes PA-NQ.....	30
Tableau III.3 Influence des volumes de NaOH sur l'absorbance des complexes (PA-NQ).....	32
Tableau III.4 Influence du temps de réaction sur l'absorbance du complexe PA- NQ.....	33
Tableau III.5 Influence de la température sur l'absorbance des complexes (PA-NQ).....	34
Tableau III.6 Linéarité : changement de variables de PA-NQ en milieu aqueux.....	35
Tableau III.7 Résultats statistiques de l'étude de la linéarité des macrolides (ERY et SPI) par la méthode spectrophotométrie.....	35
Tableau III.8a Résultats de dosage d'ERY (PA) en milieu pharmaceutique (Erybesan® 200mg/5mL, suspension buvable, Sandoz), par la méthode spectrophotométrie d'UV.....	36
Tableau III.8b Résultats de dosage de SPI (PA) en milieu pharmaceutique (Rovamyne® 3 M.U.I), par la méthode spectrophotométrie d'UV.....	36
Tableau III.9a Résultats de dosage d'ERY (PA) en milieu biologique (Poisson de Tilapia), par la méthode spectrophotométrie d'UV.....	37
Tableau III.9b Résultats de dosage de SPI (PA) en milieu biologique (Poisson Tilapia), par la méthode spectrophotométrie d'UV.....	37
Tableau IV.1 Résumé sur les échantillons des filets de Tilapia (Noir et rouge) traités.....	45
Tableau IV.4 Linéarité : changement de variables de l'érythromycine.....	49
Tableau IV.5 Linéarité : changement de variables de la spiramycine.....	50
Tableau IV.6 Rendement : changement de variables de l'érythromycine en milieu pharmaceutique.....	51
Tableau IV.7 Rendement : changement de variables de la spiramycine en milieu pharmaceutique.....	51
Tableau IV.8 Rendement : changement de variables d'échantillons dopés par les macrolides.....	52
Tableau IV.9 Rendement : changement de variables d'échantillons traités par les macrolides.....	52

Liste des abréviations

Abs: L'absorbance ou la densité optique.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AMM : Autorisation de mise sur le marché

C : Concentration de la substance à analyser

DCI : Dénomination commune internationale

ERY : Erythromycine.

ϵ : Coefficient absorbance.

HPLC: High performance liquid chromatography

I : L'intensité du faisceau émergent

I_0 : L'intensité du faisceau incident.

K : Coefficient d'absorption molaire (c'est une constante de proportionnalité de la substance absorbante qui dépend de la longueur de l'indice).

L : L'épaisseur traversée

Min : minute.

NaOH : hydroxyde de sodium.

NQ : Naphtoquinone.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

P45 : Les cytochromes

PA : principe actif.


PH : Le potentiel hydrogène

QC : Contrôle de qualité

SPI : Spiramycine.

UV : Ultraviolet.

°C : Degré Celsius



***Introduction
Générale***

Introduction Générale

Le corps humain contient un grand nombre de bactéries, dont certaines sont bénéfiques et ne causent aucune maladie, mais aident plutôt le corps dans certaines fonctions telle que l'analyse des aliments. Certains d'entre elles sont nocifs et affligent les humains de maladies et l'infection bactérienne. Lorsque cette infection est provoquée par la transmission de bactéries à une personne et que cette transmission peut provenir d'une personne infectée ou d'un milieu environnemental, ou en mangeant des aliments ou des boissons contaminés par des bactéries. L'infection bactérienne se propage rapidement et ses effets varient d'un individu à l'autre selon la résistance et l'immunité de chacun.

Le traitement de ces infections est basé sur l'utilisation des antibiotiques, qui doit répondre à des règles précises d'utilisation. Le choix de l'antibiotique clinique est habituellement reposé la sensibilité des germes responsables aux antibiotiques. En revanche, les macrolides restent le premier choix dans le traitement des infections bactériennes. En général, l'érythromycine (ERY) et la spiramycine (SPI) sont les médicaments de macrolide les plus utilisés.

La qualité du médicament affecte l'efficacité et la sécurité du traitement, et pour confirmer cette qualité, il existe plusieurs méthodes d'analyse. Dans cette étude, nous avons appliqué deux techniques différentes : méthode analyse spectroscopique en UV et méthode analyse d'HPLC pour le dosage de macrolides en milieux pharmaceutique et biologique. L'utilisation de ces méthodes représente un intérêt pour les chercheurs dans le domaine de l'analyse des médicaments.

Dans ce contexte, on se propose, dans ce mémoire de Master en Ecotoxicologie Animale, d'exploiter deux méthodes, méthode spectrophotométrique (UV) et méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), pour le dosage de l'érythromycine et de la spiramycine (ERY et SPI), dont l'objectif de contrôler la quantité de ces macrolides dans des médicaments génériques (Erybesan® et Rovamyne®) et en milieu biologique (poissons de Tilapia).

Le manuscrit que nous présentons se divise en deux parties :

❖ **Partie théorique :**

- Généralité sur les antibiotiques et les médicaments.
- Méthodes d'analyse.

❖ **Partie expérimentale :**

- Etudes spectroscopique par UV.

- Dosage chromatographique par HPLC.



CHAPITRE 1

Généralité sur les antibiotiques et les médicaments

I.1. Introduction

Les antibiotiques (dont les antibactériens) constituent une classe thérapeutique distincte dans le sens où elles sont destinées à agir sur des cellules ou des organismes vivants ce développant au détriment d'un autre organisme vivant (hôte) Comme tout organisme vivant, les bactéries sont capables de s'adapter à leurs environnements et de développer des stratégies de défense en cas d'agressions extérieures

I.2. Définition des antibiotiques

Un antibiotique est défini comme toute substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes. L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre. Plus un antibiotique détruit des types de bactéries différentes, plus son spectre est large.

Les antibiotiques sont caractérisés par [1,2].

- Activité antibactérienne (spectre d'activité) .
- Toxicité sélective (mode d'action).
- Activité en milieu organique (pharmacocinétique).
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

I.3. Rôle des antibiotiques

Les antibiotiques sont utilisés en médecine (et en médecine vétérinaire) pour lutter contre des infections bactériennes et doivent être choisis en fonction de leur efficacité sur la bactérie à combattre, ce qui peut être testé grâce à un antibiogramme [3,4].

I.4. Classification des antibiotiques

Selon l'origine taxonomique du microorganisme :

Bactéries comme les Bacillus, Actinomycétales comme les Streptomyces.

Champignons comme la pénicilline.

Selon le type d'activité antibiotique :

- Anti gram⁺ pénicilline.
- Anti gram⁻ poly myxine.

- A large spectre tétracycline.
- A action locale Soframycine.
- Antituberculeux Rifamycine.
- Antifongique Nystatine.
- Antitumoral : Rubidomycine.

Selon la structure chimique de l'antibiotique :

- Blactamines : pénicillines,
- Aminosides : Streptomycine centamycine.
- Tétracyclines : Tétracycline, Oxyteracycline.
- Macrolides : Erythromycine, Oléandomycine.
- Ansamycines : Rifamycine, Rifampicine.
- Antibiotiques divers : Chloramphénicol, acide fusidique [5].

Une partie de la pharmacologie la pharmacocinétique, étudie le sort, le devenir des médicaments introduits dans l'organisme de l'absorption l'élimination en passant par la distribution. Une autre partie, la pharmacodynamie a pour objet l'étude de l'action exercée par le médicament sur l'organisme [5].

I.4.1.Principales familles des antibiotiques

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques les principales sont les bêtalactamines (pénicillines et céphalosporines), les macrolides, les aminosides, les cyclines et les quinolones. Ces grandes familles d'antibiotiques se différencient par : leur spectre d'activité, leurs indications, leur voie d'utilisation, leur mode d'emploi et leur fréquence d'utilisation. Les antibiotiques d'usage courant sont : B-lactamines, Aminosides, Macrolides et apparentes, Tétracyclines [6,7].

I.5. Les macrolides

Les macrolides sont des antibiotiques généralement bactériostatiques utilisés en seconde intention par voie orale. Leur spectre est grossièrement celui de la pénicilline G. Leur tropisme intercellulaire très marqué leur accorde cependant des indications électives, en particulier sur les germes dont la pathogénie s'est révélée chez l'immunodéprimé la plupart d'entre eux inhibent les Cytochromes P45 et peuvent être ainsi à l'origine d'interactions médicamenteuses significatives ... [8].

I.5.1. Propriété physicochimiques des macrolides

I.5.1.1. Propriété physique

Les macrolides sont peu solubles dans l'eau. Solubles dans les solvants organiques (liposolubles). Peu d'hydroxyles ou de groupements polaires cycle lactonique apolaire assez volumineux. La présence de plusieurs carbones asymétriques leur confère une action sur la lumière polarisée variable selon les composés [9, 10].

I.5.1.2. Propriété chimique

On a 3 propriétés chimiques importantes [10].

- ❖ Structure d'hétérosides aminés à l'origine d'une bonne stabilité.
- ❖ Plusieurs fonctions basiques portées par les oses (oses aminés), et dans le cas des azalides (tulathromycine) incluses dans la structure macrocyclique.
- ❖ Présence d'hydroxyles qui permet la préparation d'esters.

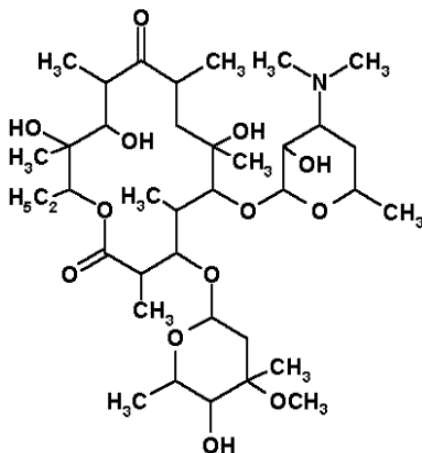


Figure I.1 Structure d'Érythromycine

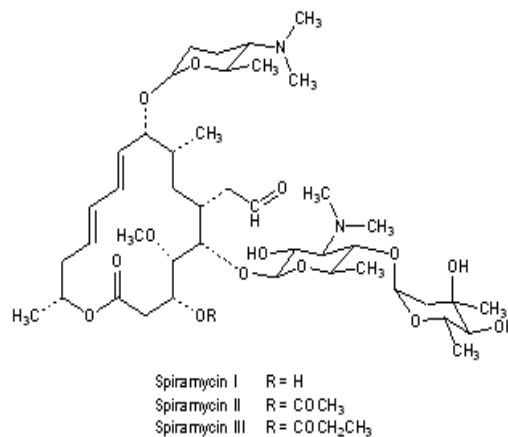


Figure I.2 Structure de Spiramycine

I.5.2. Structure et classification

I.5.2.1. Structure

Structure hétérosomique qui libère à l'hydrolyse pour aglycone une lactone macrocyclique. Lactone (ester dans un cycle) à 14, 15 ou 16 atomes reliées à trois oses aminés au maximum. Ce cycle lactonique porte deux types de substituants :

- Des hydroxyles en nombre limité.
- Des groupements méthyles.

I.5.2.2. Classification

Toutes macrolides présentent des caractéristiques similaires et quelques particularités, ils possèdent un noyau lactone centrale auquel sont liés des sucres ; au moins 2 sucres : aminés ou neutres. Il existe plusieurs classifications de macrolides, on les classe parfois en divers générations [11].

1ère génération :

- Cycle à 14 atomes de carbone : érythromycine A.
- Cycle à 16 atomes de carbone : spiramycine.

2ème génération :

- Cycle à 14 atomes de carbone : clarithromycine, roxithromycine.
- Cycle à 15 atomes de carbone : azithromycine.
- Cycle à 16 atomes de carbone : midécamycine, josamycine.

3ème génération (Kétolides) :

- Cycle à 14 atomes de carbone : télithromycine.

I.6. Erythromycine

I.6.1. Propriétés physico-chimiques

L'érythromycine est instable en milieu acide ($\text{pH} < 6,9$) par formation d'un hémiacétal par addition nucléophile de l'hydroxyle en 7 sur la cétone en 10 qui par déshydratation aboutit à la formation de l'anhydroérythromycine. Cette dernière subit une addition nucléophile de l'hydroxyle en 13 sur la double liaison en 10 pour former un dérivé de type spirokétal.

Ces pro- drogues peu solubles dans l'eau et vont être plus stables en milieu acide. En effet ils sont relargués et ainsi absorbés plus au niveau de la partie intestinale [12,13].

I.6.2. Indication

Les indications de l'érythromycine sont multiples du fait de son action sur un grand nombre de bactéries. Cet antibiotique pris par voie orale peut être utilisé pour traiter des angines, des bronchites (aigues ou chroniques), des sinusites, certaines infections de la peau (acné, érysipèles, impétigos, etc.), des infections génitales (hors gonocoque), des infections de la bouche ou du visage, des pneumopathies ou encore des rhumatismes articulaires aigus. Prise en association avec un autre antibiotique, l'érythromycine est indiquée dans le traitement des otites moyennes aigues de l'enfant. Enfin par voie cutanée, l'érythromycine est indiquée dans la prise en charge de l'acné [14,15].

I.7. Spiramycine

Ce médicament est un antibiotique qui appartient à la famille des macrolides. Il est utilisé dans le traitement de diverses infections bactériennes, notamment de la gorge, des sinus, des poumons, des bronches, de la peau, de la bouche et des dents, de l'appareil génital [16, 17].

I.7.1. Propriétés physicochimiques

Propriétés chimiques et propriétés physiques de spiramycine sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau I.1 Propriétés chimiques et physiques de spiramycine.

Propriétés chimiques	Formule	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$
	Masse molaire	843.053g/mol
	PH	8-10
Propriétés physiques	T de fusion	913.7 °C
	Densité	0.950- 1.50 g/ cm ³

I.7.2. Utilisations

Ce médicament est antibiotique qui appartient à la famille des macrolides il est utilisé dans le traitement de diverses infections bactériennes notamment de la gorge des sinues des poumons des bronches, de la peau de la bouche et des dents, de l'appareil génital. Il est également utilisé dans deux indications particulières :

- Le traitement de la toxoplasmose chez la femme enceinte.
- La prévention ponctuelle de méningites à méningocoques [18, 19].

I.8.Généralité sur les médicaments (Erybesan® et Rovamyne®)

I.8.1. Définitions de médicament

Les médicaments ne sont pas des produits comme les autres et son définit le médicament comme toute substance ou compositions présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Un médicament est une substance qui permet de prévenir traiter ou de déceler une maladie humaine ou animal, il peut être utilisé pour

combattiez de bactéries ; soulager une douleur diminuer un symptôme ou pallier une carence [20, 21].

I.8.2. Origine de médicament

I.8.2.1. Origine végétale

L'utilisation des plantes en thérapeutiques (phytothérapie) est très ancienne et connaît actuellement regain d'intérêt auprès du public-il est possible d'utiliser la plante entière ou les produits d'extractions (menthe –bourdaine).

I.8.2.2. Origine animale

Les organes animaux servent à préparer des hormones insuline, hormones hypophysaires un anticoagulant (héparine) ou des enzymes(pepsine) couramment utilisés en thérapeutique.

I.8.2.3. Origine microbiologique

Les vaccins obtenus à partir de bactéries ou des virus atténués ou tués et conférant après injections une correspondance sont classés dans cette catégorie.

I.8.2.4. Origine minéral

De nombreux minéraux ont été comme les plantes, longtemps utilisés avant le développement de la chimie organique certains d'entre eux qu'ils soient des produits naturels purifiés ou obtenus par des réactions de chimie minérale, sont encore employés. En qualité de principes actifs ou d'excipients des médicaments

I.8.2.5. Origine synthétique

Composé synthétisé ou créé par fermentations pendant la fabrication d'un ingrédient pharmacocinétique actif mais qui n'est ni purifié ni extrait avant l'étape suivante de la synthèse.

I.8.2.6. Origine biotechnologique

Un médicament biotechnologique pharmacocinétiquement actif et synthétisé par une source biologique cellule vivante ou extrait d'elle et non obtenu par la chimie de synthèse ceci inclut des protéines par exemple hormones cytokines, anticorps des vaccins ... etc. [22, 23].

I.9. Compositions et conditions des médicaments

❖ Compositions

Un médicament est composé d'une ou des plusieurs principes actifs et un d'un ou plusieurs excipients.

- **Le principe actif**

Est une molécule ou un ensemble de molécule à l'origine de l'effet thérapeutique en d'autres termes c'est elle qui est capable de soigner le malade la dénomination du principe actif.

- **Les excipients**

Sont des substances permettant la prise du médicament sans elles le principe actif ne peut être administré les excipients ont donc plusieurs fonctions comme l'administration du principe à travers une forme pharmaceutique administrable comme les comprimés, les gélules ou les sirops.

- ❖ **Conditionnement**

Le conditionnement d'un médicament est l'ensemble des éléments matériels (boîte, etc.) destinés à protéger ce médicament tout au long de son parcours. C'est aussi un support important d'informations dont la qualité contribue au bon usage du médicament [24, 25].

I.10. Cycle de vie du médicament

De la recherche jusqu'au consommateur, la vie d'un médicament suit un cycle précis. Ce dernier peut être divisé en trois principales étapes. La première étape « préparation » concerne la recherche et le développement. La deuxième étape « autorisation » englobe les procédures administratives pour la commercialisation du médicament. Enfin, la dernière étape l'utilisation est la commercialisation [26, 27].

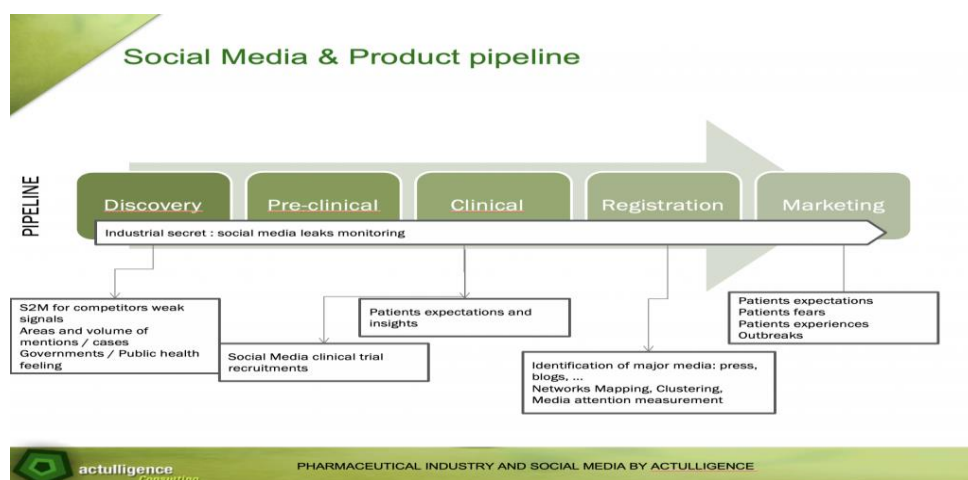


Figure I.3. Cycle de vie de médicament

I.11. Dénomination des médicaments

Le médicament a trois noms, qui sont les suivants : un nom chimique, une dénomination internationale commune (DCI) et un nom commercial [28].

➤ **Nom chimique :**

Il est le nom scientifique correspond à la formule chimique de le médicament. Ce nom est utilisé par les chercheurs.

➤ **Dénomination Commune Internationale (DCI)**

Le nom générique est en fait sa Dénomination commune internationale, la DCI. Celle-ci est attribuée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), et non choisie par le fabricant. Elle n'est pas le fruit du hasard. Elle est composée à partir de segments-clés qui renseignent notamment sur l'origine et le mode d'action pharmacologique du produit.

➤ **Nom commercial**

Le nom commercial qualifié aussi de marque ou de pharmaceutique est attribuée par le producteur du médicament (le laboratoire pharmaceutique). Cette appellation est généralement courte et facile à mémoriser Mais à la différence du nom commercial, elle pourra différer d'un pays à l'autre, aussi et il peut l'identifie comme la propriété exclusive de ce laboratoire.

I.12. Erythromycine :

L'érythromycine est un antibiotique antibactérien de la famille des macrolides. Elle agit en inhibant la synthèse des protéines bactériennes en se liant à la partie 50s du ribosome et en empêchant la translocation peptidique. Elles procèdent de l'activité antibactérienne et des caractéristiques pharmacocinétiques de l'érythromycine [29, 30].

Elles tiennent compte à la fois des études cliniques auxquelles a donné lieu ce médicament et de sa place dans l'éventail des produits antibactériens actuellement disponibles. Elles sont limitées aux infections dues aux germes définis comme sensibles, notamment dans les manifestations suivantes :

- Angines documentées à streptocoque A bêta-hémolytique, en alternative au traitement par bêtalactamines, particulièrement lorsque celui-ci ne peut être utilisé.
- Sinusites aiguës. Compte tenu du profil microbiologique de ces infections, les macrolides sont indiqués lorsqu'un traitement par une bêtalactamine est impossible.
- En cas de suspicion de pneumopathie atypique, les macrolides sont indiqués quels que soient la gravité et le terrain.

- En alternative au traitement par les cyclines, lorsque celles-ci ne peuvent être utilisées.

I.13. Erybesan® 200mg/5mL (Sandoz,Spa)

Ce médicament est indiqué dans le traitement et la prévention de certaines infections bactériennes à germes sensibles Le tableau suivant présent quelques informations sur le médicament d'Erybesan®.

Tableau I.2 Information sur Erybesan®.

Nom Commercial	Erybesan®
Dosage	200MG/5ML
Forme	GRLES. SOL. BUV.
DCI	Erythromycine
Laboratoire	Sandoz
Classe thérapeutique	Infectiologie
Classe pharmacologique	MACROLIDES & SYNERGISTINES
Conditionnement	B/12
Commercialisation	Oui
Remboursable	Non



Figure 1.4 Emballage d'Erybesan®200mg/5.

I.14. Rovamyne ®3 MUI (Hupp, Srl)

Ce médicament est indiqué dans le traitement et la prévention de certaines infections bactériennes à germes sensibles. Le tableau suivant présente quelques informations sur le médicament Rovamyne®.

Tableau I.3 Information sur Rovamyne®

Nom Commercial	Rovamyne®
Dosage	3 M.U.I
Forme	Comprimé pelliculé
DCI	Spiramycine
Laboratoire	HUPP pharmaceutical
Classe thérapeutique	Infectiologie
Classe pharmacologique	Macrolides Associations d'antibactériens
Conditionnement	/
Commercialisation	Oui
Remboursable	Oui



Figure I.5 Emballage de Rovamyne® 3 M.U.I



CHAPITRE JJ

***Aperçu sur les méthodes
physico-chimique d'analyse***

II.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

II.1.1. Chromatographie

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile) [32,33].

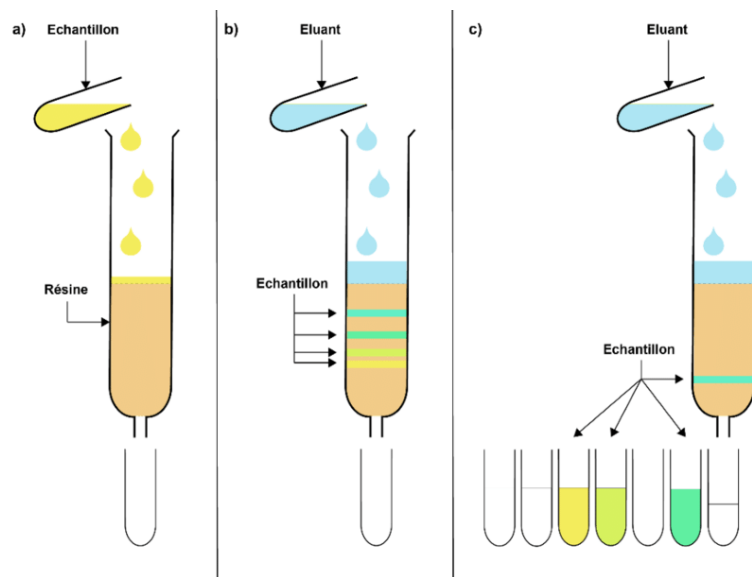


Figure II.1 Chromatographie aspects généraux [31]

II.1.2. Principe

Le principe de la chromatographie consiste à entraîner l'échantillon à l'aide d'un éluant (gazeux ou liquide) appelé phase mobile (PM), qui se déplace au contact d'une seconde phase fixée sur un support (colonne ou surface plane). Celle-ci, dite stationnaire (PS), est insoluble dans la première [33]. Chaque composé est caractérisé par un coefficient de distribution de Nernst K (appelé également coefficient de partition) défini comme suit : $K = C_s / C_m$

- C_s : concentration dans la phase stationnaire
- C_m : concentration dans la phase mobile

II.1.3. Classification des méthodes chromatographique

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon trois manières [33].

- ❖ La nature physique des phases : Dans cette classification, la phase stationnaire est un solide ou un liquide immobile fixé sur un support, alors que la phase mobile est un fluide qui peut être soit liquide soit gaz.
- ❖ Le principe du phénomène mis en jeu dans la séparation : adsorption, affinité, partage, d'exclusion, échangeurs d'ions.
- ❖ La méthode mise en œuvre (support de la phase stationnaire) : colonne ou papier (couche mince).

II.1.3.1. Classification selon la nature des phases

Les différentes méthodes chromatographiques sont [33].

- La chromatographie en phase gazeuse CPG.
- La chromatographie sur couche mince CCM.
- La chromatographie en phase liquide CPL.
- La chromatographie liquide à haute performance HPLC.
- La chromatographie en phase supercritique CPS.

II.1. 3.2. Classification selon la nature des phénomènes

On distingue quatre types de phénomènes [33].

- Chromatographie d'adsorption.
- Chromatographie de partage.
- Chromatographie ionique.
- Chromatographie d'exclusion.

II.1.4. Chromatographie liquide à haute performance

II.1.4.1. Définition

En 1968, mise au point de la Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP ou HPLC en anglais. En 1979, première séparation chirale par HPLC.

La chromatographie est une technique permettant de séparer plusieurs constituants d'un mélange en les faisant migrer, sur une phase immobile, par une phase liquide ou gazeuse. Cet article présente les principaux types de chromatographie, avec leur principe de séparation et leurs principales indications. Il propose, en dernière partie, une comparaison de ces différentes techniques [34].

II.1.4.2. Principe de HPLC

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire [34].

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatographie liquide permet le dosage de composés même à l'état de traces [34].

II.1.4.3. Appareillage

La phase mobile est pompée à partir d'une bouteille et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante. Le signal du détecteur est amplifié et enregistré [34].

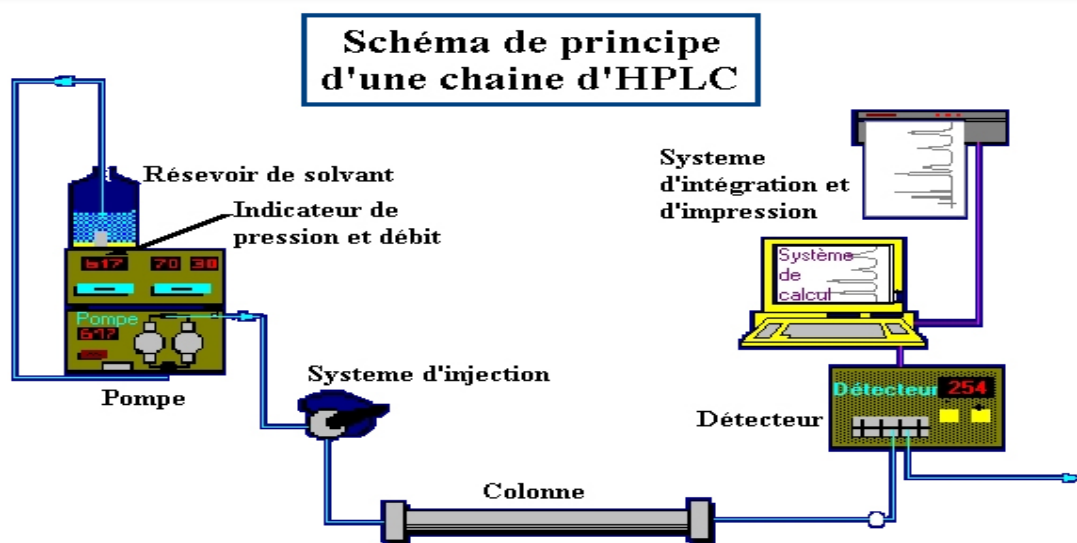


Figure II.2 Schéma de système chromatographique.

L'appareil de l'HPLC est composé de : Réservoir de la phase mobile (solvant), Pompe, Injecteur-Colonne, Détecteurs, Intégrateur.

II.1.4.4. Intérêt de la HPLC dans le contrôle qualité

Chromatographie en phase liquide à haute performance CLHP est utilisé dans l'industrie de la fabrication des produits pharmaceutiques, et des médicaments à tester les produits et les ingrédients utilisés pour les fabriquer.

Ce test est souvent effectué par le contrôle de qualité (QC), le laboratoire d'une entreprise pharmaceutique, les chimistes employés par ses fabricants de fonctionner échantillons de matières ou de produits finis par des machines de CLHP et analyser les résultats.

- Utilisés pour analyser les matières premières et les produits finis pour s'assurer que les niveaux de qualité préétablie sont respectés
- La grande sélectivité de la méthode permet le dosage des impuretés des isomères et les produits de dégradation des produits pharmaceutiques
- Identification et quantification des principes actifs et des impuretés
- Examiner la pureté la qualité des préparations pharmaceutiques

II.1.4.5. Avantages de la chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance, ou HPLC, est une technique d'analyse couramment utilisée dans le monde de la chimie et de la biochimie. Utilisé pour identifier et séparer les composés, l'équipement HPLC est beaucoup plus avancé que les autres formes de chromatographie sur colonne.

Comprendre les avantages et les inconvénients aide les scientifiques à apprécier le fonctionnement complexe de la CLHP. Technique plus efficace que l'autre [35].

- La technique chromatographique peut séparer le mélange contenant plus d'un composant.
- Il nécessite la petite quantité d'échantillon pour l'analyse.
- Méthode la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique.

II.2. Spectrophotométrie UV-Visible

II.2.1. Définition

La spectrophotométrie est le domaine qu'étude la mesure de l'énergie transportée par les rayonnements électromagnétique dans le domaine de la lumière visible. La spectrophotométrie UV-visible est une technique analytique fondée sur l'étude du changement de la lumière traversant une solution colorée, dans un domaine d'application comprise entre 200 et 800 nm, en effet pour pouvoir déterminer les concentrations des substances absorbantes [36].

II.2.2. Principe de la spectrophotométrie UV-visible

L'UV-visible s'applique à des produits contenant un groupement chromophore, surtout les molécules contenant au moins noyau aromatique ou un radical, aussi sur les composés hétérocycliques. Lorsqu'un faisceau de radiation monochromatique parallèle traverse sous

incidence normale un milieu absorbant homogène et constitué d'une solution de N composés dissous ne réagissent pas les uns sur les autres, l'absorbance de l'ensemble est égale à la somme des absorbances spécifiques. Lors de ce processus, la molécule passe de l'état fondamentale à l'état excité.

La spectrophotométrie UV-visible s'occupe des électrons de valence, les transitions possibles seront les électrons des orbitales moléculaires liante ou non liante et orbitale moléculaire anti-liante [37].

II.2.2.1. Loi de Beer-Lambert

Les applications analytiques de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-Visible concernent les molécules en solution. Elles peuvent être qualitatives et quantitatives. Elles sont appelées la loi de Beer-Lambert.

La loi de Beer-Lambert établit la relation entre l'intensité transmise I et l'intensité incidente I_0 .

$$I = I_0 \times \text{Exp}(-KIC).$$

Avec:

I : l'intensité du faisceau émergent

I_0 : l'intensité du faisceau incident.

K : coefficient d'absorption molaire (c'est une constante de proportionnalité de la substance absorbante qui dépend de la longueur d'onde).

C : concentration de la substance à analyser (mol/l).

l : l'épaisseur traversée (cm).

La relation fondamentale utilisée en spectrophotométrie est présentée sous la forme

$$A = \log I/I_0 = \epsilon C l \text{ (ou } \epsilon = K/2.303).$$

Avec :

A : l'absorbance ou la densité optique.

ϵ : coefficient d'absorbance.

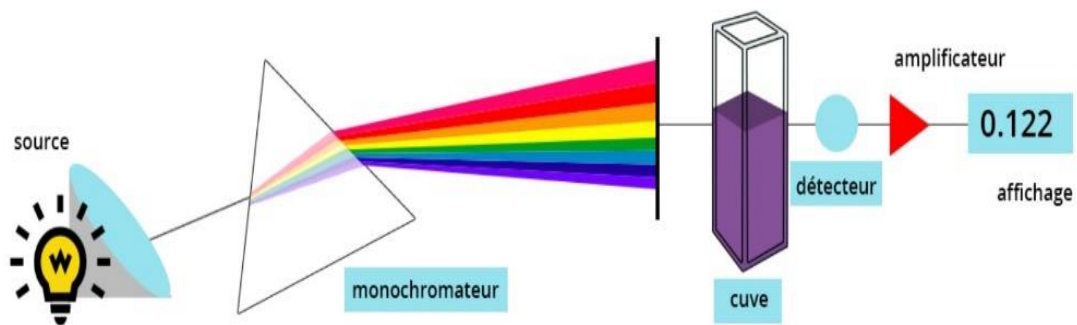
Cette relation est utilisée pour réaliser des dosages ou des suivis cinétiques.

II.2.3. Appareillage

L'appareillage est assez simple et extrêmement robuste. Il ne nécessite pas d'entretien fréquent à part celui de la cuve (amovible) qui doit être parfaitement propre et sans rayures. Il existe également des cuves jetables pour une plus grande facilité d'entretien. Il est constitué d'une lampe (source du rayonnement) émettant dans tout le spectre UV-visible (lampe avec filament de

tungstène, ou à arc au xénon par exemple), d'un monochromateur et d'un détecteur du rayonnement final. Le tout est relié à un ordinateur qui en permet le contrôle [38].

Le monochromateur permet de sélectionner les longueurs d'onde de travail. Il est basé sur le principe d'un réseau de diffraction permettant de séparer les longueurs d'onde à la manière d'un prisme. Pour un bon fonctionnement, la lampe doit être régulièrement changée. Le réseau de diffraction doit être vérifié afin de s'assurer qu'il n'y a pas un décalage entre la longueur d'onde demandée et la longueur d'onde réelle. Pour ce faire au moins une fois par an, des filtres très précis sont placés à la place de la cuve et l'on vérifie que la longueur d'onde détectée correspond bien à la



longueur d'onde théorique [39].

Figure II.3 Schéma de principe d'un spectrophotomètre.

❖ Sources lumineuses

Beaucoup de spectromètres comportent deux lampes à usage de sources :

- Une lampe à arc au deutérium sous moyenne pression pour la partie UV (<350 nm).
- Une lampe à incandescence avec un filament de tungstène et une enveloppe de verre de silice (Quartz) pour la partie visible du spectre (à partir de 350 nm). La lampe à arc xénon qui couvre tout le domaine de 200 à 1100nm, est utilisée pour les appareils de routine. Cette source plus Énergétique est souvent utilisée. Elle est choisie comme source unique par les constructeurs Lorsqu'il s'agit d'un appareil de routine allant de 300 à 1100nm [39].

❖ Cellules

La cellule d'analyse se présente sous forme de parallélépipède à base carrée de 1 cm de trajet Optique ayant deux faces opposées polies.

On utilise des cuves en plastique transparent (milieu aqueux) ou en verre ordinaire (milieu Aqueux et organique), destinées aux mesures dans le domaine du visible et des cuves en quartz Pour les mesures dans le domaine de l'ultraviolet[39].

❖ **Sélecteur de longueurs d'onde - Le monochromateur**

Le monochromateur, est un système qui permet d'extraire de la lumière émise par la source, Un domaine étroit de son spectre d'émission et de sélectionner les longueurs d'onde du spectre. Il est constitué d'une fente d'entrée, d'un système de dispersion et d'une fente de sortie [39].

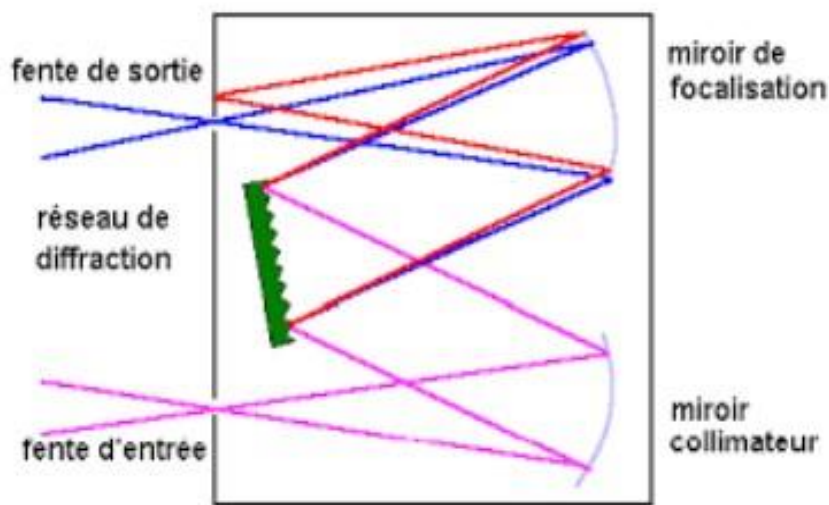


Figure II.4 Schéma Monochromateur à réseau.

❖ **Détecteurs**

Le signal lumineux est converti en signal électrique à l'aide d'un détecteur photo électrique.

On utilise soit un tube photomultiplicateur, soit un semi-conducteur (détecteur à transfert de charge ou photodiode au silicium) [39].

➤ **Une photodiode (semi-conducteur)**

Lorsqu'un photon rencontre un semi-conducteur, il peut transférer un électron de la bande envalence vers la bande de conduction (d'un niveau plus bas vers un niveau plus haut).

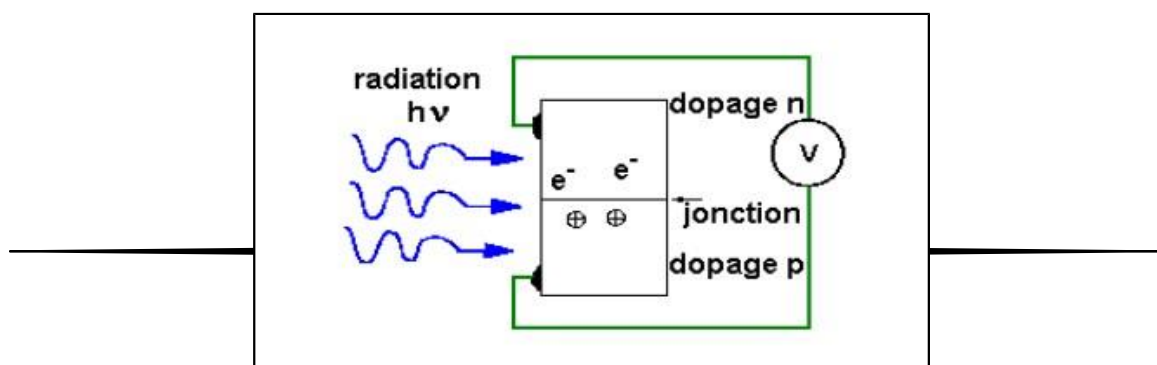


Figure II.5 Une Photodiode.

➤ Barrette de diode

L'emploi d'une barrette de diode permet une mesure simultanée sur toute l'étendue du spectre.

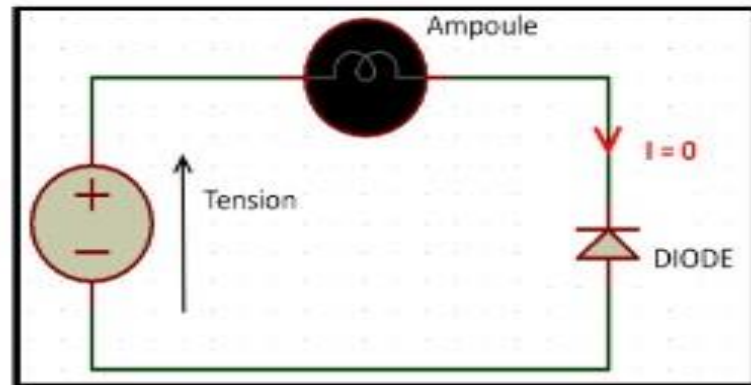
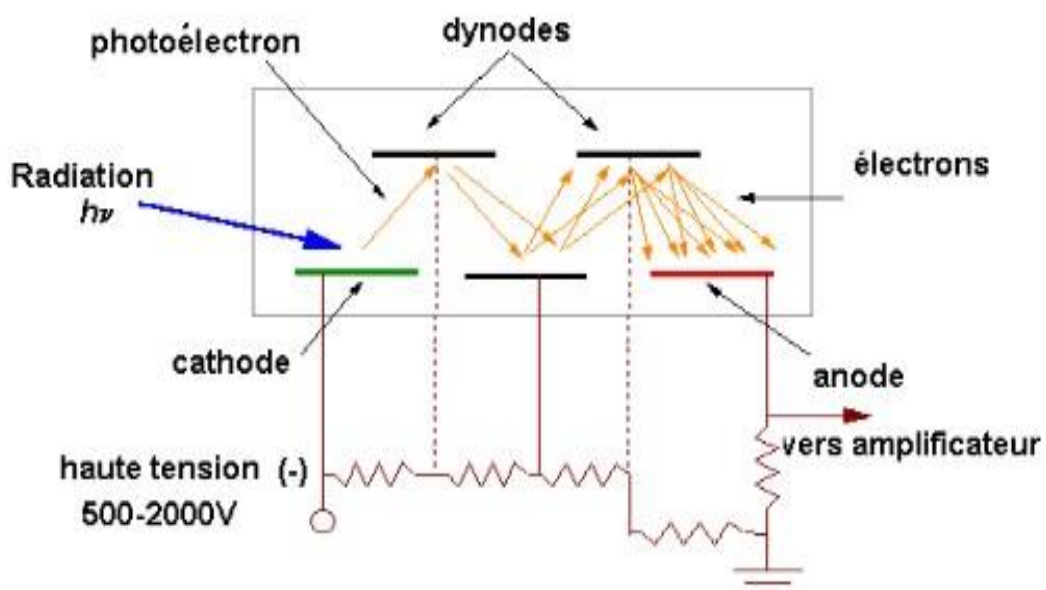


Figure II.6: Une diode.

➤ Un photomultiplicateur

Une radiation incidente arrache un électron de la cathode par effet photoélectrique, cet électron est alors accéléré vers une seconde électrode avec un potentiel élevé, l'énergie alors de l'électron incident est suffisante pour arracher d'autres électrons et ainsi de suite d'où l'effet



multiplicatif [39].

Figure II.7 Schéma Photomultiplicateur

II.2.4. Conditions d'utilisation d'un solvant en UV visible

Le spectre UV-Visible la solution doit être placée dans une cellule convenable, transparent à la lumière dans la bande de fréquences étudiées.

Afin d'obtenir un spectre UV-visible, la solution est soumise aux rayonnements dont la longueur d'onde est comprise dans l'intervalle 200-400 nm (domaine des ultraviolets) et dans l'intervalle 400-800 nm (domaine de la lumière visible)[39].

II.2.5. Applications

La spectrophotométrie UV-visible est une méthode facile à mettre en œuvre elle est utilisée aussi bien pour l'analyse qualitative que quantitative.

II.2.5.a. Analyses qualitatives

Les spectres UV fournissent généralement peu de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres IR. Néanmoins, on les utilise soit pour une confirmation soit pour une identification grâce aux règles empiriques [40].

II.2.5.b. Analyses quantitatives

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert [40].

- Comme applications, on peut citer :
- Dosage du fer dans l'eau ou dans un médicament
- Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique
- Dosage du benzène dans le cyclohexane

II.2.6. Principes d'étalonnage avec spectrophotométrie

Le principe de la spectrophotométrie est simple : l'appareil réalise une mesure de l'intensité de la lumière qu'il reçoit, une fois celle-ci passée à travers un récipient transparent (cuvette dont la matière doit être adaptée à la longueur d'onde), contenant la solution à étudier. Un dosage par étalonnage utilisant la spectrophotométrie permet la détermination d'une concentration d'un soluté coloré en solution aqueuse à partir d'une droite d'étalonnage. Dans le cas où la mesure spectrale

fonctionne en « mode double faisceau », la transmission du filtre est obtenue en faisant le rapport entre le signal « la voie de référence » [40].



CHAPITRE III

***Dosage d'érythromycine et de
la spiramycine par une
méthode spectrophotométrique
d'UV***

III. Introduction

Le développement des méthodes spectrophotométriques pour la détermination de l'érythromycine, et la spiramycine dans les produits pharmaceutiques a été réalisé. Afin d'atteindre la sensibilité maximale, l'optimisation des conditions expérimentales a été faite, en explorant la réaction de transfert de charge des macrolides avec un agent dérivant de type NQ.

L'effet de la nature du solvant, l'influence de la concentration du réactif, l'influence de la concentration du milieu alcalin (NaOH), le temps nécessaire pour compléter la réaction, et l'influence de la température ont été étudiés.

III.1. Matériel

III.1.1. Appareillage

Toutes les études spectrophotométriques ont été faites avec un double faisceau UV/Vis Lambda 365, Ultraviolet-Visible spectrophotomètre. Les spectres étaient automatiquement obtenus par le logiciel UV- Express Ver.4.1.0. Les absorbances en UV ont été mesurées en utilisant des cuves en quartz (1cm).

La température a été contrôlée par une étuve de modèle MEMMERT (Büchenbach, Allemagne). Les solutions ont été préparées et ensuite agitées à l'aide d'un agitateur de Vortex. Une balance électronique a été utilisée pour peser les échantillons.

III.1.2. Produits chimiques

III.1.2.1. Etalons

Les étalons de l'érythromycine et la spiramycine ont été achetés chez la maison Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

III.1.2.2. Produits pharmaceutiques

Les produits pharmaceutiques utilisés au cours de cette étude sont : Erybesan®200 mg/ 5mL (SANDOZ SPA, Algérie), Rovamyne® 3 M.U.I ; (HUPP Pharma, Algérie).

Tous les produits ont été utilisés tels quels et leurs solutions ont été fraîchement préparées chaque jour.

III.1.2.3. Réactifs et solvants organiques

Hydroxyde de sodium de qualité analytique a été acheté chez Sigma-Aldrich (Stein hem, Allemagne). Le méthanol, l'éthanol et l'acétone (HPLC grade) sont de la même source. Le 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (Ménadione, $C_{11}H_8O_2$) provenait également de Sigma-Aldrich

(Steinheim, Allemagne). L'eau distillée était produite par notre laboratoire à l'aide du système Milli-Q (Burgwedel, Allemagne), et filtrée sur des membranes type FH de diamètre 0,45 µm.

III.2. Méthode expérimentale

III.2.1. Préparation des solutions

❖ Solutions mères d'érythromycine et de spiramycine

Deux solutions mères ont été préparées ; dans la première nous avons mélangé 40mg standard pur avec 10 ml de méthanol, et dans la seconde nous avons mélangé 10mg de spiramycine avec 10 ml d'acétonitrile afin d'obtenir une solution mère des concentrations de 4 mg/ml (ERY) et de 1 mg/ml (SPI).

❖ Solutions des échantillons pharmaceutiques

La préparation des échantillons d'Erybesan® et de Rovamyne® a été effectuée comme suit :

Une portion pesée équivalente au poids de 500 mg de produits pharmaceutique a été transférée dans une fiole jaugée de 100 mL, soniquée pendant 5 min avec environ 10 mL de tampon phosphate (pH 6,5) - acétonitrile (7 : 3, v / v), puis la solution a été diluée au volume avec le même solvant.

Le mélange a été bien mélangé, a laissé jusqu'à toute la matière insoluble se déposer, et puis filtrer à travers un filtre de Millipore GS 0,22 µm.

Un volume mesuré du filtrat a été dilué quantitativement avec le même solvant pour donner une solution ayant une concentration de travail.

III.2.2. Préparation du réactif NQ

La solution de naphthoquinone NQ (0,2%, m/v) a été préparée dans une fiole jaugée, en dissolvant 0,2 g du réactif NQ dans 100 mL d'eau distillée. La solution a été fraîchement préparée et mise à l'abri de la lumière.

III.2.3. Procédure de dérivation chimique

Pour chaque méthode, un volume de 1,0 mL de macrolide d'une concentration bien définie a été transféré dans une fiole jaugée de 10 mL. Puis des volumes V1 mL de solution d'hydroxyde de sodium (0,2 M) ont été ajoutés, suivi par des autres volumes de V2 mL de NQ 0,2% (m/ v). Ces solutions ont été agitées et maintenues à température ambiante pendant quelques minutes (t min). Après la dilution, l'absorbance a été mesurée à 458 nm, en utilisant le blanc correspondant à chaque test.

III.2.4. Optimisation de conditions expérimentales

La recherche des conditions analytiques optimales a été faite d'une manière graduelle. Les paramètres qui influent sur la sélectivité de la méthode spectrophotométrie ont été étudiés. Ils sont : nature du solvant, concentration du réactif NQ (0,25-2,5 mL), concentration de l'hydroxyde de sodium (0,25-2,5 mL), le temps de la réaction (5-60 min) et la température (25-80 °C).

III.2.5. Application de la méthode d'analyse

III.2.5.1. Linéarité

Il s'agit de vérifier la linéarité de : l'érythromycine, et la spiramycine. Le protocole appliqué à la linéarité nécessite des dilutions successives dans un intervalle de 5 concentrations de 15 à 55 µg/mL. Chaque solution a été testée trois fois (n=3).

III.2.5.2. Dosage des médicaments

Afin d'étudier le rendement de la méthode, pour chaque médicament, nous avons préparé quatre solutions à 15, 25, 35 et 45 µg/mL. Chaque solution a été analysée 3 fois par la méthode d'analyse.

III.2.5.3. Dosage en milieu biologique

Les échantillons biologiques ont été préparés selon le même protocole expérimental qui sera décrit dans le chapitre VI.

III.3. Résultats et discussion

III.3.1. Détermination de la longueur d'onde maximale

Le spectrophotomètre UV-Visible est universel et utilisé dans plusieurs études. Elles sont appropriées d'autant qu'elles permettent un dosage rapide des médicaments [41]. C'est un moyen disponible dans la majorité des laboratoires et intégré dans la plupart des appareils d'analyse (ex : HPLC).

Le naphthoquinone (NQ) a été utilisé pour la détermination de nombreuses des amines en milieux pharmaceutiques [42-48]. La réaction entre les macrolides et le NQ en milieu basique (NaOH), entraîne à la formation des complexes de couleur orange. Afin de déterminer la longueur d'onde maximale de chaque complexe en UV, nous avons effectué une série de mesures spectrophotométriques, après le prétraitement des échantillons de macrolides avec le naphthoquinone, pour déterminer l'absorption maximale du complexe Macrolide-NQ par un balayage entre 400 et 600nm. Selon les résultats obtenus (Figure III.1) et les informations données par la bibliographie, on a fixé notre choix sur la valeur 458 nm, car les complexes de macrolide

présentent une importante absorbance en UV à cette longueur d'onde, avec des réponses optimums du détecteur.

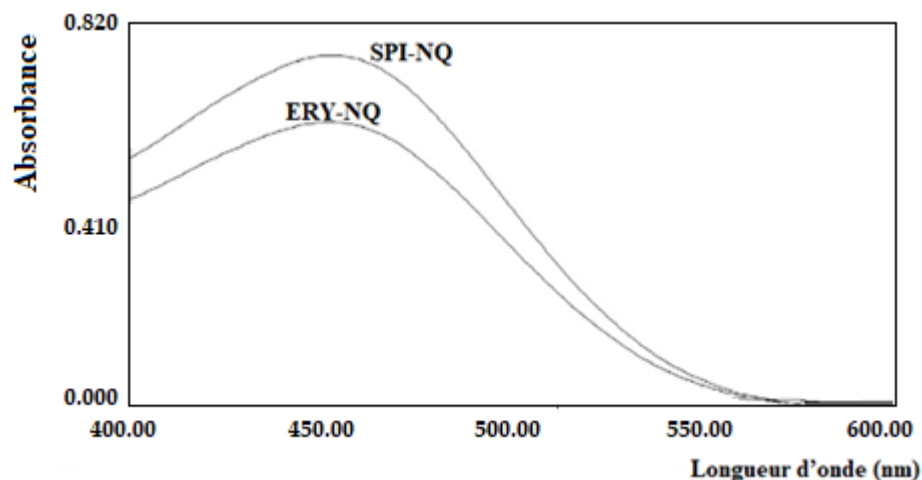


Figure.III.1 Spectres d'absorption en UV des complexes Macrolide-NQ.

III.3.2. Optimisation de conditions de la dérivation chimique

III.3.2.1. Influence des solvants :

Dans notre étude, la nature du solvant est un facteur important affectant sur la réaction du NQ avec le macrolide, car il joue un rôle de faciliter le transfert des charges, ce qui permet la dissociation ou la stabilisation des complexes formés.

Pour voir l'influence du solvant sur la formation de complexes PA-NQ, plusieurs solvants répandus en ce domaine ont été testés, et les résultats de cette étude sont donnés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Influence de la nature du solvant sur l'absorbance de PA-NQ.

Solvants		H ₂ O	Méthanol	Ethanol	Acétone
Absorbance	ERY-NQ	0,752	0,548	0,493	0,135
	SPI-NQ	0,917	0,717	0,621	0,321

En vue de cette étude, l'éthanol a été étudié en tant que solvant de la réaction. Ce solvant a donné le même comportement que celui obtenu avec le méthanol (Figure. III.2). Un autre solvant organique (l'acétone) a été également examiné mais, les résultats d'absorbance étaient très faibles.

Dans une autre étape, l'eau a été utilisée et elle s'est avérée plus appropriée et montrée une excellente absorbance en UV.

Notons que, la meilleure sensibilité du détecteur a été atteinte avec de l'eau. Ceci probablement à cause de la grande solubilité du NQ dans l'eau et de sa capacité de former des liaisons hydrogène stables avec le complexe.

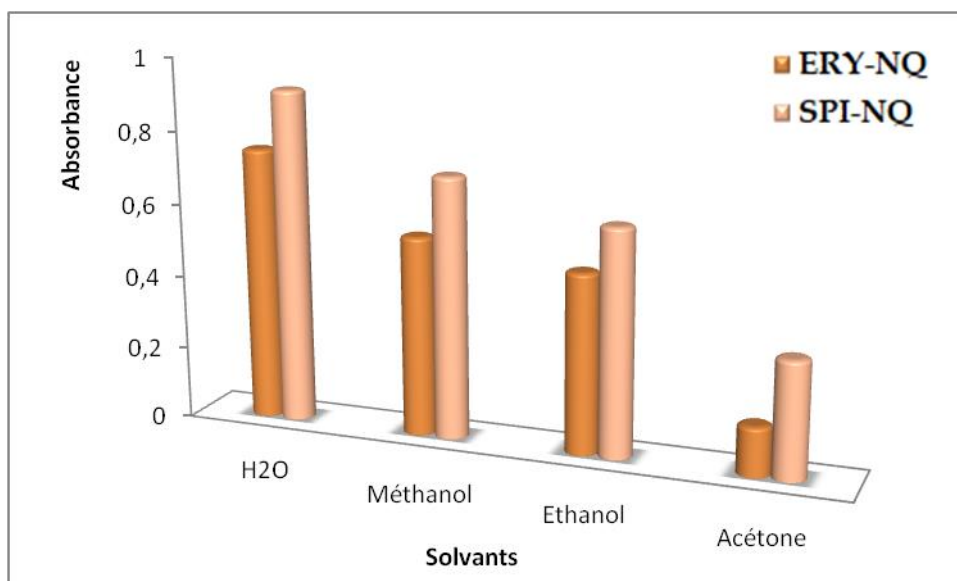


Figure. III.2 Influence de la nature du solvant sur l'absorbance de PA-NQ.

Basé sur les résultats obtenus, on a conclu que le milieu aqueux (eau) est nécessaire pour l'optimisation de la réaction de notre système. Par conséquent, et afin d'obtenir la plus haute sensibilité pour notre méthode, l'eau a été choisie comme solvant pour la suite de notre travail.

III.3.2.2. Effet de la concentration du réactif (volumes de NQ)

La concentration d'agent de dérivation NQ est un facteur plus important, contribuant à la formation des dérivés PA-NQ. L'augmentation de la quantité de ce réactif favorise la réaction et permet d'obtenir une bonne quantification. L'étude bibliographique faite sur ce genre de dérivation montre que, la concentration théorique appropriée de NQ est de 0,2% m/v. Dans cette partie du travail, on va étudier le changement de la concentration de NQ, pour ne pas avoir un excès de NQ, et diminuer la consommation de ce produit, avec des bonnes absorbances des complexes PA-NQ. A cet effet, la concentration de ce réactif dans solutions a été examinée, en faisant varier le volume de NQ à 0,2% (m / v), dans une gamme de 0,25-2,5 mL, tandis que les concentrations des macrolides sont maintenue à 45 µg/mL. Les résultats sont présentés dans le (Tableau III.2.)

Tableau III.2 Effet de la concentration du NQ sur l'absorbance des complexes PA-NQ

V _{NQ} (mL)	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	2,25	2,5
Abs ERY	0,3	0,4	0,6	0,8	0,9	1	0,99	0,98	0,9	0,8
Abs SPI	0,4	0,7	0,8	1	1,2	1,4	1,39	1,3	1,2	1,1

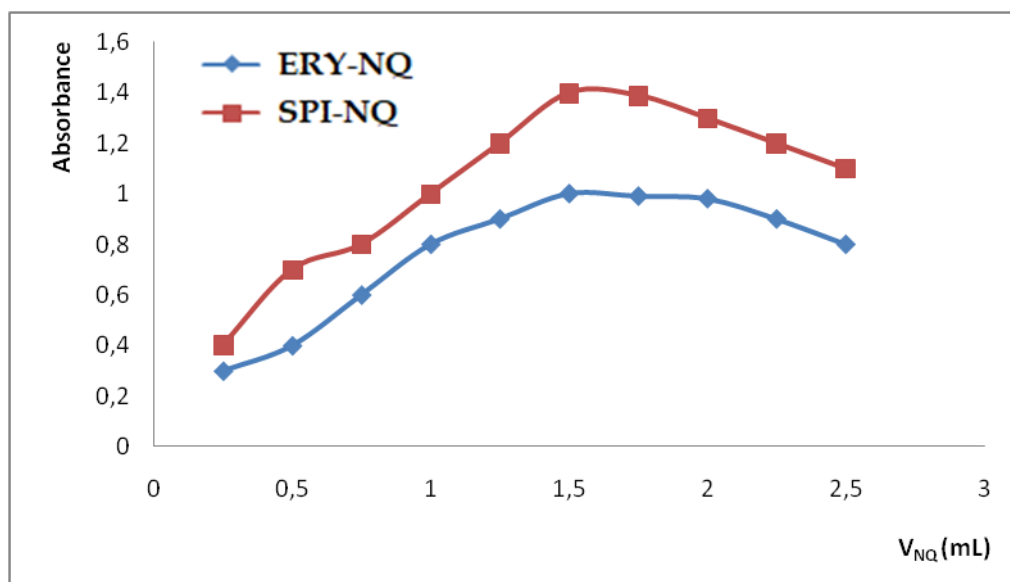


Figure.III.3 Effet de la concentration du réactif (volumes NQ) sur l'absorbance de complexe PA-NQ.

La Figure (III.3) représente la variation de la concentration de NQ en fonction de l'absorbance des dérivés obtenus (ERY-NQ et SPI-NQ). L'observation de ces courbes montre que, dans l'intervalle de 0,25- V_{optimal} mL, l'augmentation de la concentration en NQ conduit à l'augmentation de l'absorbance.

Ensuite, l'absorbance va diminuer par l'augmentation de la concentration en NQ à partir de cette valeur, mais avec une faible variation, ce qui nous permet de dire que les volumes plus élevés de NQ n'ont eu aucun effet sur les valeurs d'absorption. Cette étude a révélé que la réaction dépendait du réactif de NQ.

On observe également que, la plus haute absorbance a été atteinte lorsque le volume de NQ est : 1,5 mL pour les deux macrolides ERY et SPI. En se basant sur ces résultats obtenus, on a décidé de choisir cette concentration de NQ pour la suite des travaux.

III.3.2.3. Influence du milieu alcalin (volumes de NaOH)

Dans les réactions de dérivation, le NQ va réagir avec les groupes d'amines des macrolides, et former des produits chromophores de couleur orange en milieu alcalin (hydroxyde de sodium).

Dans des tests préliminaires, la réaction a été testée dans : l'hydroxyde de sodium, l'hydrogénophosphate di-sodique, le borax et le bicarbonate de sodium. Les meilleurs résultats ont été obtenus dans le cas de l'hydroxyde de sodium et avec une concentration de 0,2 M.

Pour montrer l'influence du milieu alcalin sur les réactions de dérivation, une série des essais a été faite avec des volumes différents de NaOH (0,2 M). Les mesures de l'absorbance ont été réalisées après 20 minutes qui suivent la préparation des échantillons. Les résultats de l'influence de

la concentration de NaOH sur la formation des complexes (ERY-NQ et SPI-NQ) à une température ambiante sont regroupés dans le tableau III.3.

Tableau III.3 influences des volumes de NaOH sur l'absorbance des complexes (PA-NQ).

V _{NaOH} (mL)	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	2,25	2,5
Abs Ery	0,6	0,8	1,1	1,4	1,3	1,29	1,2	1,15	1,1	1
Abs SPI	0,7	1,1	1,5	1,6	1,7	1,75	1,6	1,5	1,4	1,3

La concentration optimale de l'hydroxyde de sodium a été déterminée, en ajoutant divers volumes de NaOH (0,2 M) aux milieux réactionnels, dans la gamme de 0,25-2,5 mL. Les résultats ont montré que l'absorbance du complexe augmente en fonction de l'augmentation du volume de NaOH jusqu'à une concentration particulière (V_{optimal}) et diminue par la suite (Figure. III.4). Cela probablement a été attribué à l'augmentation des ions d'hydroxyde qui va affecter sur la réaction de dérivation.

Les absorbances maximales ont été trouvées aux volumes de NaOH de 1,0 mL pour l'ERY et 1,5 mL pour la SPI. Par conséquent, ces volumes ont été choisis comme des valeurs optimales.

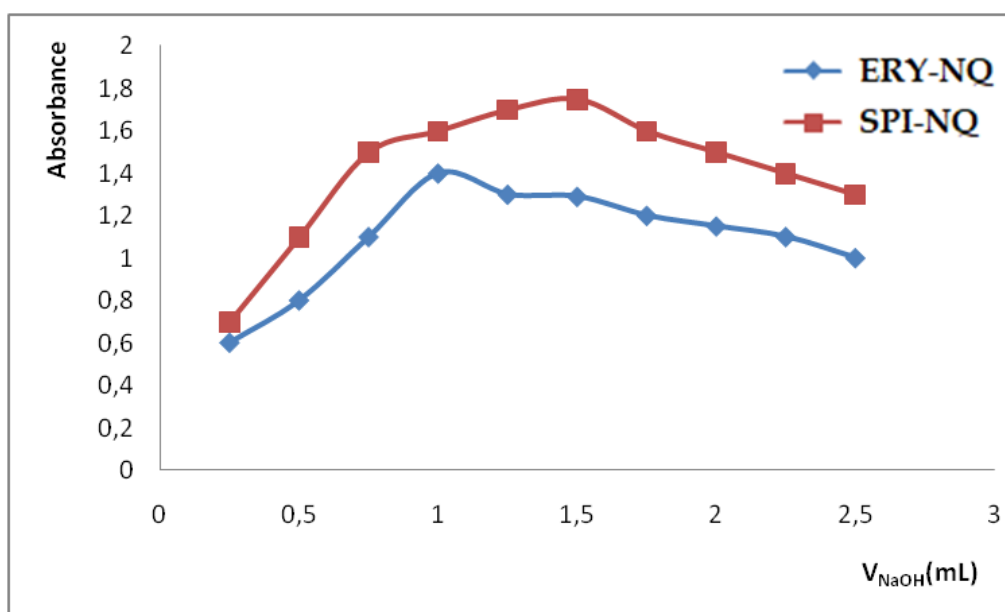


Figure. III.4 Influence du milieu alcalin (volumes de NaOH) sur l'absorbance des complexes (ERY-NQ et SPI-NQ).

III.3.2.4. Influence du temps de réaction :

Au vu des bons résultats obtenus avec l'agent de dérivation NQ, une étude de l'influence du temps de réaction sur la formation et la stabilité des complexes (ERY-NQ et SPI-NQ) a été réalisée.

Les résultats obtenus sont représentés par la figure III.5. L'effet du temps sur les réactions de dérivation dans le milieu alcalin a été étudié à différentes valeurs (0-60 minutes), par un contrôle

continu de l'absorbance à longueur d'onde sélectionnée (458 nm). La figure III.5 montre la variation de l'absorbance des complexes en fonction du temps.

Dans l'intervalle du temps examiné, une augmentation d'absorbance a été observée depuis le début de la réaction jusqu'à une valeur optimale. Après cette période et jusqu'à 60 minutes, l'absorbance est restée presque stable avec une variation négligeable. Il a été constaté que la réaction est quantitativement complète lorsque le mélange réactionnel était laissé pendant 15 minutes, et tout retard des mesures jusqu'à 1 h n'ont eu aucun effet sur la réaction. Par conséquent, afin de supprimer l'effet du temps et de rendre les méthodes plus rapides, toutes les mesures d'absorbance ont été effectuées après 15 minutes du début de la réaction concernée.

Tableau III.4 Influence du temps de réaction sur l'absorbance du complexe PA- NQ.

Temps (min)	5	10	15	20	25	30	35	40
Abs ERY	1,15	1,25	1,35	1,3	1,25	1,15	1	0,75
Abs SPI	1,3	1,6	1,75	1,7	1,6	1,5	1,3	1,25

Au vu de ces résultats, les réactions ont été complètes en 15 min pour les deux macrolides (érythromycine et spiramycine) en utilisant le NQ (Figure.III.5).

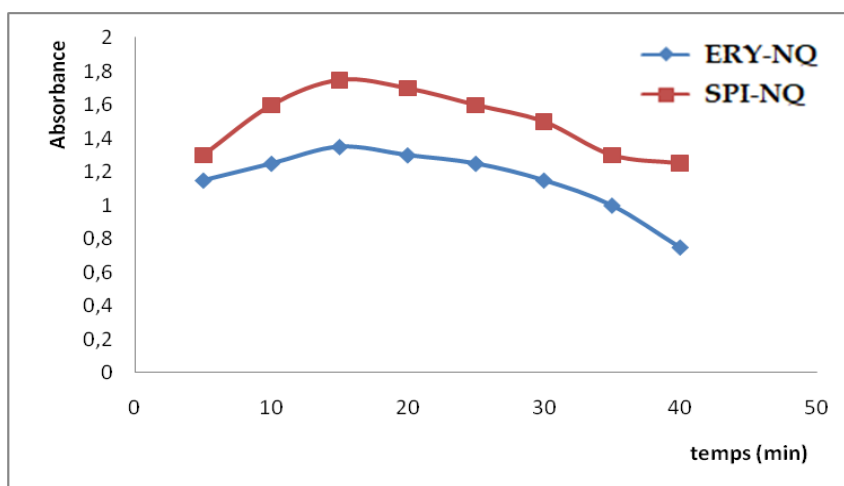


Figure. III.5 Influence du temps de réaction sur l'absorbance des complexes PA- NQ.

III.3.2.5. Influence de la température

Généralement la température joue un rôle important dans les réactions chimiques, elle peut activer ou provoquer le système réactionnel. Pour montrer l'effet de la température sur la réaction de dérivaison entre les macrolides et le NQ, et sur la stabilité des complexes formés, nous avons

choisisept valeurs de température quison : 25, 30, 40, 50, 60, 70 et 80°C. Ce choix est basé sur les travaux effectués par le chercheur Paesen [49].

Des mélanges de macrolide (ERY ou SPI) avec le réactif NQ, en milieu alcalin ont été préparés et étudiés.

Les absorbances des complexes formés (ERY-NQ et SPI-NQ) à différentes températures (25-80 °C) ont été enregistrées, et les résultats sont donnés dans le tableau. III.5.

Tableau III.5 Influence de la température sur l'absorbance des complexes (PA-NQ).

T (°C)	25	30	40	50	60	70	80
Abs (ERY-NQ)	1,26	1,21	1,24	1,2	1,22	1,19	1,17
Abs (SPI-NQ)	1,76	1,74	1,73	1,74	1,72	1,75	1,71

La Figure III.6 montre la variation de l'absorbance des complexes en fonction de la variation de la température.

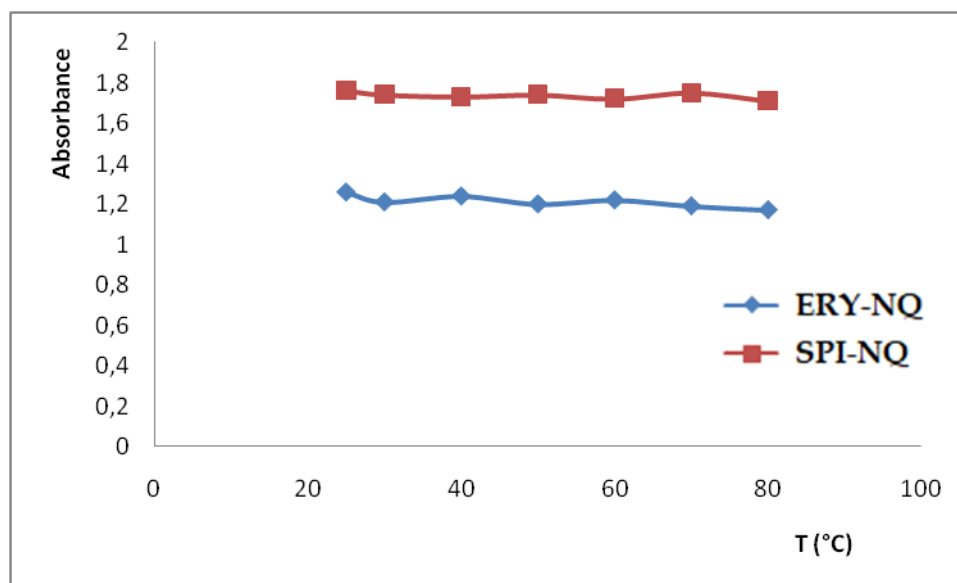


Figure. III.6 Influence de la température sur l'absorbance du complexe PA-NQ.

Les résultats des absorbances maximales des complexes ont révélé que l'augmentation de la température avait un effet négligeable sur la réaction de dérivation dans le milieu alcalin.

Il a été constaté que les complexes ont été formés instantanément à une température ambiante, et que la réaction n'a pas été affectée par l'augmentant de la température. Ceci est probablement attribué à l'instabilité des complexes de macrolides (PA-NQ).

Par conséquent et au vu des résultats obtenus, notre choix a été fixé à la température ambiante (25 °C), comme valeur optimum et plus pratique.

III.3.3. Linéarité

Dans les conditions optimales décrites, les courbes d'étalonnage pour les deux macrolides ont été construites en traçant l'absorbance de PA-NQ en fonction de la concentration de macrolide (Tableau III.6 et Figure. III.7).

Tableau III.6: Linéarité : changement de variables de PA-NQ en milieu aqueux.

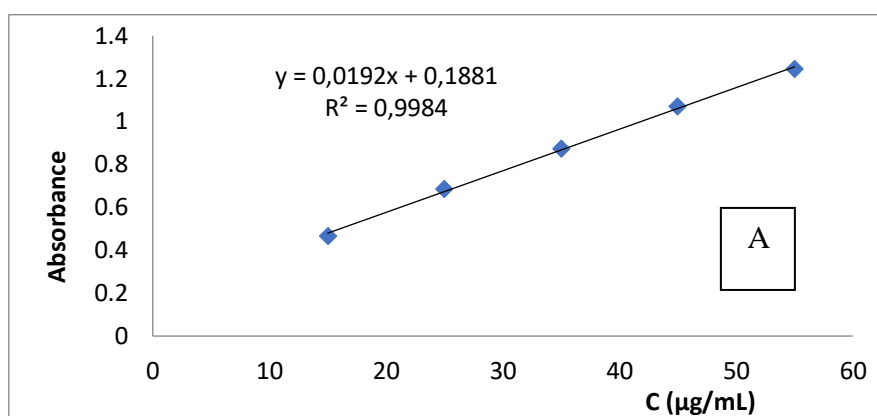
C (µg/mL)	15	25	35	45	55
Abs (ERY-NQ)	0,4654	0,6866	0,8737	1,0698	1,2429
Abs (SPI-NQ)	0,7496	0,9953	1,1874	1,4538	1,7126

La conformité de la loi de Béer-Lambert doit être évidente dans la gamme des concentrations étudiées. Les équations de régression, la gamme des concentrations, coefficients de corrélation, ont été reportés dans le tableau III.7.

Tableau III.7 : Résultats statistiques de l'étude de la linéarité des macrolides (ERY et SPI) par la méthode spectrophotométrie.

Composé	Equation de calibration	R ²
Abs (ERY-NQ)	$Y = 0,0192x + 0,1881$	0,9984
Abs (SPI-NQ)	$Y = 0,0233x + 0,3852$	0,9975

D'après le tableau III.7 et la figure III.6, la loi de la Béer était respectée dans la gamme des concentrations de 15,0-55,0 µg/mL. Une corrélation linéaire entre l'absorbance des complexes formés PA-NQ et la concentration de macrolide a été trouvée, en utilisant la longueur d'onde maximale. La valeur de coefficient de corrélation était supérieure à 0,9990, indiquant la bonne linéarité de la méthode pour les deux macrolides dans la gamme de concentrations étudiées.



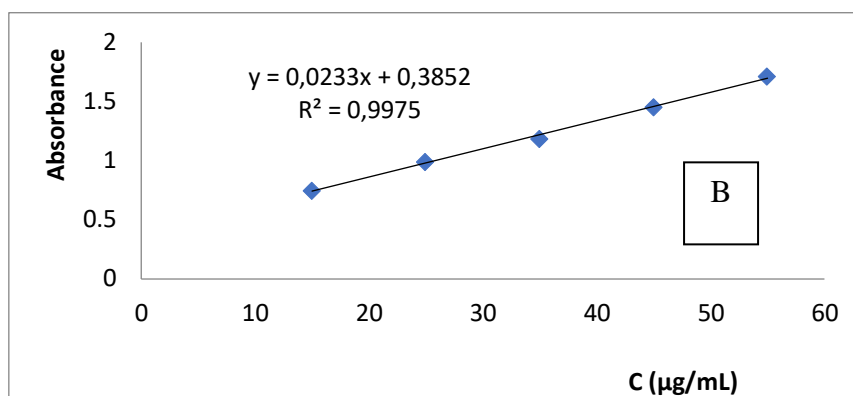


Figure III.7 Courbes d'étalonnages du détecteur en milieu aqueux (A : érythromycine et B : spiramycine).

III.3.4. Applications à l'analyse des produits pharmaceutiques

Suite à l'application des méthodes développées à l'analyse des produits pharmaceutiques (médicaments disponibles ; Erybesan® et Rovamyne® 3 M.U.I), les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux III.8a et III.8b. Comme on peut voir dans ces derniers tableaux, les valeurs obtenues par ces méthodes sont concordantes avec ceux indiquées par les fabricants, et sont également dans les limites autorisées par les pharmacopées.

Des taux de rendement dans l'intervalle de 96,0 à 99,05% ont été obtenus. Ceci indiquant que les méthodes mises au point sont exactes et convenables, pour la détermination d'érythromycine et de spiramycine dans les médicaments sans aucune interférence matricielle.

Tableau III.8a Résultats de dosage d'ERY (PA) en milieu pharmaceutique (Erybesan® 200mg/5mL, suspension buvable, Sandoz), par la méthode spectrophotométrie d'UV.

Concentration théorique d'ERY (µg/mL)	15	25	35	45
Concentration expérimentale d'ERY (µg/mL)	14,6025	24,7800	33,6035	42,5385
Rendement ρ (%)	97,35	99,12	96,01	94,53

Tableau III.8b Résultats de dosage de SPI (PA) en milieu pharmaceutique (Rovamyne® 3 M.U.I), par la méthode spectrophotométrie d'UV

Concentration théorique de SPI (µg/mL)	15	25	35	45
Concentration expérimentale de SPI (µg/mL)	14,8890	23,8550	34,2930	43,5780
Rendement ρ (%)	99,26	95,42	97,98	96,84

III.3.5. Applications au dosage de macrolides en milieu biologique

Les macrolides ont été identifiés comme un antibiotique préoccupant pour le compartiment aquatique en raison de son mode de consommation, de son rejet continu, de sa persistance dans l'environnement et de ses propriétés toxiques. De plus, elles sont incluses dans la liste des produits pharmaceutiques de classe I - haute priorité, nécessitant d'études écotoxicologiques spécifiques[50].

Plusieurs travaux ont montré que les résidus de macrolides pouvaient exercer des effets nuisibles sur différents organismes aquatiques non ciblés, tels qu'une diminution du taux de croissance et de la reproduction, notamment chez les poissons. Certaines études ont évalué les effets de macrolides sur les poissons, démontrant qu'il peut affecter la vie sauvage en induisant des effets nocifs même à des concentrations résiduelles.

Les résidus d'antibiotiques présents dans les denrées alimentaires d'origine animale sont les traces de traitements médicamenteux antibiotiques reçus par l'animal de son vivant. Les méthodes mises en œuvre pour rechercher les résidus sont diverses.

Dans cette étude, nous avons soumis les extraits des poissons de Tilapia à de faibles concentrations de macrolides (ERY et SPI) et à leurs doses légales utilisées en aquaculture.

Pour déterminer la récupération (rendement) des étalons à partir d'échantillons dopés, ajouter de solutions étalons à l'échantillon de poisson pour obtenir des concentrations finales de travail. Laissez les échantillons dopés s'équilibrer à température ambiante pendant 15 à 30 minutes avant de les homogénéiser. Ensuite, traiter et analyser les échantillons dopés comme décrit précédemment. Les résultats des rendements obtenus sont regroupés dans les tableaux III.9a et III.9b.

Les valeurs de rendements sont trouvées dans l'intervalle de 61,82 à 70,91%, ce qu'indiquer que ces méthodes spectroscopiques sont très convenables pour le dosage de l'érythromycine et de la spiramycine dans les organismes aquatiques, particulièrement les poissons de Tilapia, sans aucune interférence matricielle.

Tableau III.9a Résultats de dosage d'ERY (PA) en milieu biologique (Poisson de Tilapia), par la méthode spectrophotométrie d'UV.

Concentration théorique d'ERY ($\mu\text{g/mL}$)	15	25	35
Concentration expérimentale d'ERY ($\mu\text{g/mL}$)	9,886	17,7275	22,2075
Rendement ρ (%)	65,77	70,91	63,45

Tableau III.9b Résultats de dosage de SPI (PA) en milieu biologique (Poisson Tilapia), par la méthode spectrophotométrie d'UV.

Concentration théorique de			
-----------------------------------	--	--	--

SPI ($\mu\text{g/mL}$)	15	25	35
Concentration expérimentale de SPI ($\mu\text{g/mL}$)	10,24	15,4555	24,1395
Rendement ρ (%)	68,32	61,82	68,97

Cette méthode a de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes analytiques en termes de simplicité, sensibilité, rapidité, coût des instruments, précision et sélectivité. Au vu de ces avantages, cette méthode peut être utilisée pour le contrôle de la qualité en routine de ces macrolides.

III.4. Conclusion

La méthode proposée dans ce travail s'est avérée être une excellente alternative, pour la détermination de l'érythromycine et la spiramycine dans leurs produits pharmaceutiques et dans certains milieux biologiques (Poisson Tilapia). Cette méthode développée est basée sur la mesure de l'absorbance par la spectrophotométrie UV-Visible, des mélanges simples de macrolide avec de colorant (NQ) en milieu alcalin.

Elle présente une sensibilité et une sélectivité adéquates, permettant des bons dosages de ces macrolides dans les deux milieux.

De plus, cette méthode présente certains avantages tels que, l'utilisation d'instruments moins chers (spectrophotomètre à faisceau unique ou double) et des produits chimiques à faible coût.

Du point de vue pratique, cette méthode a nécessité un traitement minimal des échantillons, ce qui nous a permis d'atteindre une meilleure efficacité. La réaction de transfert de charge entre le macrolide et le NQ, a été améliorée dans le milieu alcalin. Cette réaction était rapide dans ce milieu, et permettant la mesure de l'absorbance dans une période de 15,0 min.

Les courbes d'étalonnages (linéaires) ont été obtenues dans la gamme de 15-55 mg/mL, ce qui rend cette méthode très appropriée, pour le contrôle de qualité des macrolides en routine.

De plus, cette méthode développée peut être réalisée à une température ambiante, et convienne à l'application dans les laboratoires lorsque les techniques chromatographiques ne sont pas disponibles.



CHAPITRE IV

***Dosage d'érythromycine et de
la spiramycine par une
méthode biologique***

IV.1. Matériels et méthodes

Avant de passer à la quantification de l'érythromycine et de la spiramycine dans les produits pharmaceutiques, il est nécessaire d'améliorer les paramètres chromatographiques d'analyse tels que la phase mobile, la phase stationnaire et la température, et par la suite, il a fallu procéder au dosage de l'érythromycine et spiramycine dans les milieux pharmaceutiques et biologiques.

A- Etude en milieu pharmaceutique

IV.1.1. Appareillage de HPLC

A la lumière de cette étude, nous avons adopté le chromatographe d'HPLC de type SHIMADZU, Série de LC-10A équipé de :

- Un dégazeur de type modèle DOU-10 A (SHIMADZU). Il sert à enlever les bulles d'air emprisonnées dans la phase mobile.
- Une pompe de haute pression modèle LC-10 AVP (SHIMADZU). Il nous permette d'assurer l'écoulement d'un solvant ou un mélange constant de solvants.
- Un détecteur d'UV-Vis modèle SPD- 10AVP (SHIMADZU), ce détecteur est muni de deux lampes : l'une lampe à deutérium "D2" et l'une autre de tungstène "W". Quand la première lampe est allumée la longueur d'onde peut être fixé dans un point de l'intervalle allant de 190 à 370 nm, par contre si la deuxième lampe est allumée, la longueur d'onde peut être fixé dans un point de l'intervalle allant de 370 à 900 nm.
- Une colonne analytique en phase inverse nommée C18 de type ODB-RP 18 de INTERCHIM (250 mm X 4,6 mm, 5 µm).
- Une vanne d'injection modèle de RHEODYNE (CC, USA) à boucle échantillonnage d'une capacité de 20µl.
- Système de contrôle (intégrateur) Modèle SCL-10 AVP (SHIMADZU), c'est une commande de tous les composants de la série, son menu d'affichage est simple et il est lié directement à l'ordinateur.
- L'ordinateur, système d'exploitation supportant un logiciel pilote de traitement de données de modèle Class VP, version 1.2. Il nous permet de manipuler et d'analyser d'une manière très aisée les chromatogrammes obtenus. Ce logiciel nous permet aussi de gérer certains paramètres de détection et de quantification avec lesquels on doit travailler à savoir le débit, la pression de pompe, la longueur d'onde, le temps d'analyse.
- Flacons, Ils sont en verre, un réservoir de la phase mobile, un récipient des déchets d'analyse et de la phase mobile après purgation de la tuyauterie.
- Une tuyauterie qui est fait de 3 types de tube :

- 1) Tuyau en plastique 1 cm.
- 2) Tuyau en plastique 0.5 cm.
- 3) Tuyau en plastique 2 cm.

IV.1.2. Autres matériels

a) Dispositif de filtration

Le dispositif de filtration utilisé est fourni par PHYWE. Tous les liquides utilisés dans l'HPLC doivent passer par ce dispositif. L'emploi de ce dernier nous permet de prévenir les parasites des pics.

b) Balance analytique

C'est une balance très sensible dont les caractéristiques sont : Marque SALTEC, Max :210 g, D : 0,1mg, Tare : 0,00000.

c) Seringues d'injections

Il en existe des seringues de différentes capacités de 20 – 250 μ l et ils sont de type Syringe Perfection.

d) Agitateur vibrant

De type VORTEX.

e) Flacons stériles

Où nous avons met les solutions mères des standards ainsi que les différentes dilutions réalisées.

f) Macro-pipette digitale

Cette macro-pipette à volume réglable est de type EUROSMART. Elle a une capacité volumique de 1 à10 mL.

g) Bain à Ultra-son

Le bain ultrason que nous avons utilisé est de type ULTRASON PRO.

h) Filtre millipore

Le papier filtre utilisé pour filtrer les solutions de la phase mobile est de type Millipore GS (0,22 μ m). (Milford, MA, USA).

IV.1.3. Solvants et produits chimiques

Il est souvent nécessaire en HPLC de faire des mélanges de solvant pour obtenir polarité souhaitée. On utilise pour cela des mélanges de force éluant de catégorie de HPLC et les réactifs étaient de catégorie analytique. L'acétonitrile et le méthanol sont le
Souvent utilisés.

Tous les solvants et solutions seront filtrés à l'aide de la membrane filtre et dégazés avant l'emploi avec un bain ultrason, et l'eau utilisée est pure.

a) Standard pur (Etalons)

Durant le travail que nous avons réalisé, les standards purs de l'érythromycine et spiramycine de Sigma (Steinheim, Germany) sont utilisés.

b) Caractéristiques chimiques du standard

Le standard possède les caractéristiques chimiques suivantes :

- nom du produit : érythromycine.
- une formule chimique de : $C_{37}H_{67}NO_{13}$
- sa masse molaire : $733,9268 \pm 0,0384$ g / mole.
- nom du laboratoire fabricant : SIGMA.
- nom du produit : spiramycine
- sa masse molaire : $C_{43}H_{74}NO_{13}$ -
- sa masse molaire :: $843,053$ g / mole.
- nom du laboratoire fabricant : HUPP

L'érythromycine est un antibiotique macrolide qui a un spectre antimicrobien similaire ou légèrement plus large que celui des pénicillines. Elle est souvent utilisée chez des personnes allergiques aux pénicillines. Cet antibiotique est ont été extrait d'une bactérie Streptomyces en 1950.

La spiramycine est un antibiotique de la famille des macrolides employé dans le traitement d'infections dentaires et pulmonaires. Elle a été décrite en 1954 et produite par la bactérie. Ce macrolide qui nous a été fourni est une poudre blanche, très hygroscopique, sans odeur. Sous sa forme de base, il est peu soluble dans l'eau, en revanche il est soluble dans les solvants organiques.

c) Éluant et diluants

- Acétonitrile pour HPLC (SIGMA-ALDRICH).
- Méthanol pour HPLC (SIGMA-ALDRICH).
- 2-méthyl-2-propanol pour HPLC (Sigma-Aldrich).

d) Autre produits chimiques

Les autres produits chimiques que nous avons utilisés sont :

- L'eau : il est type eau pur pour la chromatographie.

- Sel d'hydrogène-phosphate di-potassique K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich).

IV.1.4. Protocole générale d'analyse

a) Préparation des solutions de travail

a.1. Solutions mères d'érythromycine et de spiramycine

Les solutions mères (étalons) et les solutions de travail d'érythromycine et de spiramycine ont été préparées selon les mêmes protocoles expérimentaux qui sont décrits dans le chapitre III.

Les dilutions ont été réalisées en utilisant de l'eau distillée, miscible avec le méthanol, ce qui permet d'avoir des solutions homogènes. Les solutions alcalines d'hydroxyde de sodium ont été également préparées dans l'eau distillée.

a.2. Solutions des échantillons pharmaceutiques

La préparation des échantillons pharmaceutiques d'Erybesan® et de Rovamyne® a été effectuée selon les mêmes protocoles expérimentaux qui sont décrits dans le chapitre III. Après la filtration à travers un filtre de $0,22 \mu m$, un volume mesuré du filtrat a été dilué quantitativement avec le même solvant pour donner une solution ayant une concentration de travail.

a.3. Solution de la phase mobile

La phase mobile suivante a été utilisée :

Acétonitrile – 2-méthyl-2-propanol – tampon déphosphate de potassium 0,025 M (pH6,5) (33 : 7 : jusqu'à 100, v / v / v), le débit était de 1,0 L/min.

b) Optimisation des paramètres d'analyses

Afin de pouvoir connaître la détection et la quantification d'un antibiotique par HPLC, il faut toujours passer par l'optimisation des paramètres de détection et de quantification. Ces paramètres sont les suivants :

- La phase stationnaire : celle-ci peut être en phase normale, ou en phase inverse. Le choix de cette phase dépend bien sûr de la phase mobile qui sera utilisée pour l'analyse. Si la phase mobile est polaire, la phase stationnaire doit être non polaire (chromatographie en phase inverse). Si au contraire la phase mobile est non polaire, la phase stationnaire doit être polaire (chromatographie est dite en phase normale).

- La phase mobile en mode isocratique, la phase mobile est maintenue constante durant toute la durée d'analyse. En mode gradient d'élution, la composition de la phase mobile est modifiée progressivement avec le temps.

- Le débit : Il correspond toujours à une pression donnée et qui est généré par la ou les pompes, Il est exprimé en mL/min.
- Spectre d'absorption : ou bien la longueur d'onde dans laquelle l'antibiotique absorbe le maximum de lumière.
- La durée d'analyse : fixée par rapport au temps de rétention de la molécule à analyser dans la colonne analytique.

B- Etude en milieu biologique

IV.1.5 Matériels et produit chimique

a) Appareillage d'HPLC

Les essais chromatographiques de cette étude ont été réalisés dans deux laboratoires déférents à savoir ; le Laboratoire de PLBVB de l'ENS de Kouba (Alger) et le Laboratoire central de la police scientifique (Wilaya d'Alger). Par conséquence, deux systèmes chromatographiques en phase liquide (HPLC) ont été utilisés, l'un est de modèle HPLC- Agilent, Série de 1260 (CA, USA) et l'autre système est de modèle HPLC- Agilent, Série de 1100 (CA, USA). Les composants caractéristiques de chaque système sont regroupés dans les tableaux suivants :

1) Système chromatographique N° 1 :

Laboratoire de PLBVB de l'ENS de Kouba	
Chromatographe d'HPLC de type	Agilent HPLC, Série de 1260
Dégazeur de type	1260 Infinity High Performance Degasser
Une pompe à haute pression	1260 Infinity II BinaryPump
Un détecteur d'UV-Vis modèle	1260 Infinity II Diode Array Detector HS
Colonne analytique en phase inverse nommée	C18 de type Zorbax (150 mm X 4,6 mm, 5 µm).
Vanne d'injection modèle	1260 Infinity II Manual Injector (CC, USA) à boucle échantillonnage d'une capacité de 20µl.
Système de contrôle (intégrateur) Modèle	Agilent 1260 Infinity II LC System
Un logiciel pilote	Lab Advisor software, version B.02.10

2) Système chromatographique N° 2

Laboratoire Central de la Police Scientifique (Wilaya d'Alger)	
Chromatographe d'HPLC de type	Agilent HPLC, Série de 1100
Dégazeur de type	1100 Infinity High Performance Degasser
Une pompe à haute pression	1100 Infinity II Binary Pump
Un détecteur d'UV-Vis modèle	1100 Infinity II Diode Array Detector HS
Colonne analytique en phase inverse nommée	C18 de type Zorbax (150 mm X 4,6 mm, 5 µm).
Vanne d'injection modèle	1100 Infinity II Manual Injector (CC, USA) à boucle échantillonnage d'une capacité de 20µl.
Système de contrôle (intégrateur) Modèle	Agilent 1100 Infinity II LC System
Un logiciel pilote	Lab Advisor software, version B.02.10

b) Autres appareillages et matériels

-Balance, Centrifugeuse, Agitateur magnétique.

-Becher, Boit d'incision, les tubes, hachoir domestique, micropipette

c) Produits chimiques

Acide nitrique, Acide citrique, Méthanol, eau ionisée, érythromycine, spiramycine.

IV.1.6. Echantillons biologique

Nous avons étudié deux types d'échantillons :

- 1) Echantillons des filets de Tilapia rouge dopés par 1 mL d'une solution de macrolide (ERY et SPI) avec une concentration bien défini.
- 2) Echantillons des filets de Tilapia (Noir et rouge) traités par l'érythromycine, qui sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau IV.1 Résumé sur les échantillons des filets de Tilapia (Noir et rouge) traités.

N° d'échantillon	01	02	03	04	05	06	07	08
Traitements - ÉRY (µg) : Balnéation/10 Jours.	1,7	10	300	300	60	300	0	10
Code d'échantillon	Aq2 – (197g)	Aq3– (65g)	Aq5 – (44,8g)	Aq5– (3,0g)	Aq4 – (35,0g)	Aq5 – (52,3g)	Aq6 – (44,0g)	Aq3 – (35,79g)

IV.1.7. Préparation et extractions des échantillons

- Nous coupons les filets de Tilapia (Noir et rouge) sans peau petites morceaux en séparant d'abord la peau du tissu musculaire, puis nous en coupons le tissu musculaire en petite morceaux (environ 2x2 mm).
- Nous mélangeons une portion de 2g de tissu musculaire dans robot ménager pour obtenir une consistance pâteuse uniforme.
- Peser 2g de tissu mélangé
- Nous mettons 2 mL de mélange de tissu homogène dans un tube à essai puis nous ajoutons :
 - 1 mL d'acide nitrique (30 %)
 - 4 mL de méthanol
 - 1 mL d'eau d'ionisée
 - 0,1 mL d'acide citrique

Après avoir préparé le mélange nous le laissons 15 minutes puis on met dans la centrifugeuse à 5300 rpm pendant 10 minutes et d'une filtration à travers un filtre en nylon de 0,45 µm.

Ensuite, 20 µl de la solution ont été injectés dans le système d'HPLC.

IV.2. Résultats et discussion

A- Etude en milieu pharmaceutique

IV.2.1. Optimisation de conditions chromatographiques

Des analyses ont été réalisées pour optimisation et améliorer les conditions de séparation. Les conditions chromatographiques ont été modifiées progressivement jusqu'à atteindre l'optimalité[51].

La pratique de recherche susmentionnée implique la réalisation d'un grand nombre d'analyses, impliquant des variations arbitraires des conditions opératoires. Toutefois, ce mode opératoire est consommateur de solvants, d'échantillons, d'énergie et de temps. Dans cette perspective, une meilleure méthode d'analyse a été adoptée. Cette méthode consiste à modifier les conditions d'analyse en fonction des résultats préliminaires obtenus par le chromatogramme de reconnaissance. Par la suite, le processus s'affine graduellement pour atteindre les conditions optimales en un temps relativement court. Grâce à cette méthode, il est possible de réaliser une analyse approfondie tout en minimisant la consommation des ressources[52-57].

La recherche des conditions analytiques optimales pour les différentes colonnes chromatographiques a été effectuée progressivement, en explorant différentes phases mobiles,

débits et températures. Les paramètres qui ont un impact sur la sélectivité de la méthode chromatographique comprennent la polarité de la phase mobile, le pH, les tampons, les débits, la température de la colonne et la phase stationnaire.

Pour atteindre les objectifs de ce travail, il est essentiel de prendre en compte les facteurs chromatographiques pour déterminer les conditions optimales qui permettront une bonne séparation avec des pics acceptables et un temps d'analyse raisonnable. Cela est les considérations les plus raisonnables pour la réussite de cette étude. Ils ont été achevés en utilisant les conditions chromatographiques optimales cités ci-dessus :

-Phase mobile.....ACN/2-méthyle-2-propanol/ K_2HPO_4 de 0,025M à pH 6,5 (33 :7 :60, v/v/v).

-Colonne.....ODB RP 18.

-Longueur d'onde (UV).....215 nm (ERY) et 232 nm (SPI).

-Volume injecté.....20 μ l.

-Débit1,0 mL/min.

-Température de la colonne25°C.

L'analyse chromatographique que nous avons réalisée avec ERY et SPI, nous a permis d'obtenir les chromatogrammes illustrés par la figure IV.1-2.

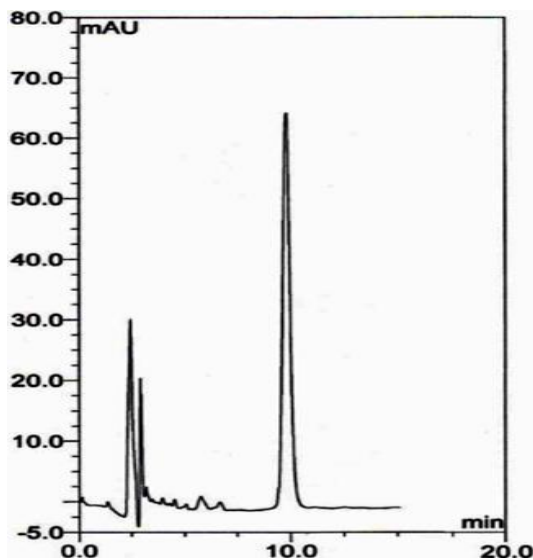


Figure IV.1 Chromatogramme obtenu avec le standard d'érythromycine à une longueur d'onde de 215 nm.

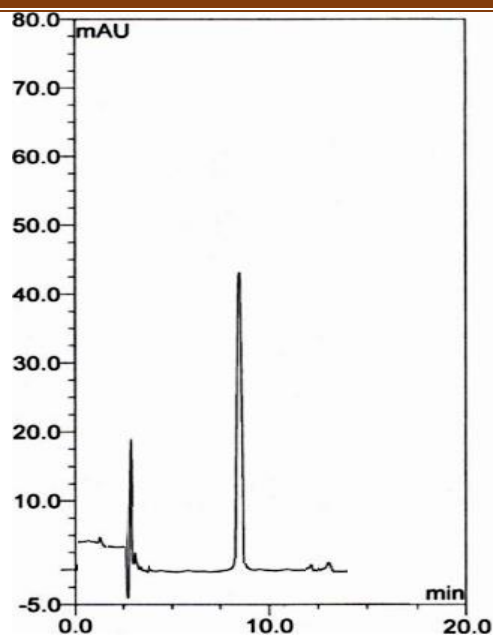


Figure IV.2 Chromatogramme obtenu avec le standard de spiramycine à une longueur d'onde de 232 nm.

Ces chromatogrammes sont obtenus avec des longueurs d'ondes sélectives (215 et 232 nm). Il nous montre qu'avec ces deux longueurs d'ondes, les molécules apparentes d'érythromycine et de spiramycine sont détectées et cela se traduit par l'apparition de plusieurs pics différents et qui ont aussi des temps de rétention suffisamment différents des deux macrolides. Ces résultats s'expliquent par le fait que les composés étudiés absorbent la lumière UV au 215-232 nm et cela se présente sous forme des pics symétriques.

Plusieurs essais ont été réalisés en utilisant le standard afin de commencer l'optimisation des paramètres de détection et de quantification de l'érythromycine et de spiramycine. Les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants, donc nous avons entrepris une optimisation des paramètres. Les conditions chromatographiques sélectionnées pour poursuivre nos travaux (voir tableau IV.1) sont le résultat d'une optimisation qui a impliqué le choix de la phase stationnaire, le changement du solvant organique dans la phase mobile, la longueur d'onde d'absorption, le débit, l'éluant dans lequel le standard sera dissout, ainsi que la quantité injectée.

Tableau IV.2 Les paramètres retenus pour la détection et la quantification de l'érythromycine.

	Paramètre retenu
Phase mobile	ACN/2-methyl-2-propanol/ K ₂ HPO ₄
Diluant	Méthanol
Phase stationnaire	Phase inverse (C18)
Longueur d'onde	215 nm
Débit	1,0 mL/min
Quantité injectée	20µl
Durée d'analyse	15 minutes

Tableau IV.3 Les paramètres retenus pour la détection et la quantification de la spiramycine.

	Paramètre retenu
Phase mobile	ACN/2-methyl-2-propanol/ K ₂ HPO ₄
Diluant	Méthanol
Phase stationnaire	Phase inverse (C18)
Longueur d'onde	232 nm
Débit	1,0 mL/min
Quantité injectée	20µl
Durée d'analyse	10 minutes

Avant de pouvoir évaluer les paramètres optimisés pour la détection et la quantification de l'érythromycine et la spiramycine dans les médicaments, une analyse statistique a été réalisée pour confirmer la linéarité de la méthode utilisée, en utilisant le standard. De plus, une courbe d'étalonnage a été établie comme point de référence pour le dosage de cet antibiotique.

IV.2.2. Courbes d'étalonnages

Différentes concentrations de solutions ont été obtenues à partir des standards d'érythromycine et de spiramycine. Chaque solution a été préparée en utilisant une pesée distincte de poudre et un volume de solvant et elles sont indépendantes les unes des autres.

La linéarité de la méthode est vérifiée sur 5 points de gamme d'étalonnage [55] dans le domaine de concentrations étudié : 0,0015 à 0,075mg/mL pour l'érythromycine et 0,0003 à 0,025mg/ml pour la spiramycine (tableaux IV.4 et IV.5).

Les coefficients de corrélations (r^2) sont : 0,9993 pour l'érythromycine et 0,9994 pour la spiramycine, ces valeurs de r^2 se sont avérées acceptables et significatives. Ce qui nous conduisons à conclure qu'elle montre une bonne linéarité. Les droites de régressions sont établies (Figures IV.3A et IV.3B) et les équations de ces droites sont :

$$\text{ERY} : y=45967,0x+175,62$$

$$\text{SPI} : y=554613,0x+2914,20$$

Où :

X : sont les valeurs de hauteur de pic et,

Y : les valeurs de concentration en mg/ mL.

Tableau. IV.4 Linéarité : changement de variables de l'érythromycine.

x (mg/mL)	0,0750	0,0500	0,0150	0,0050	0,0015
y	3640,0	2455,7	849,5	364,0	303,0

Y : Moyenne des hauteurs en $\mu A. U$; x : Concentration en mg/mL

Tableau. IV.5 Linéarité : changement de variables de la spiramycine.

x (mg/mL)	0,02500	0,01000	0,0050	0,00125	0,00030
y	16837,0	8244,05	5830,1	3614,7	3089,3

y : Moyenne des hauteurs en $\mu A. U$; x : Concentration en mg/mL.

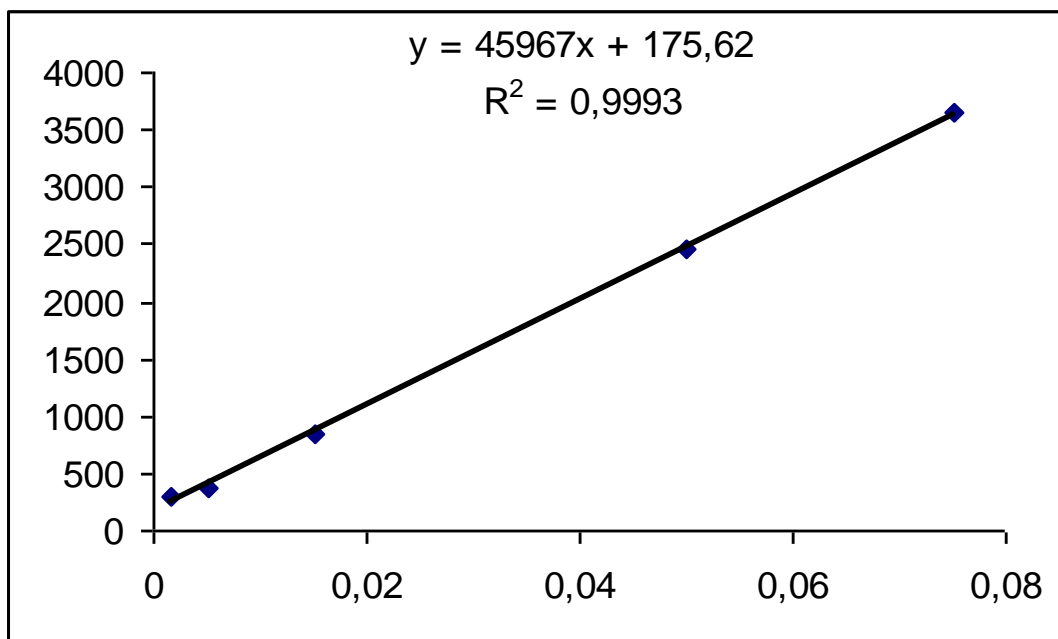


Figure .IV.3 Courbe d'étalonnage du détecteur pour l'érythromycine.

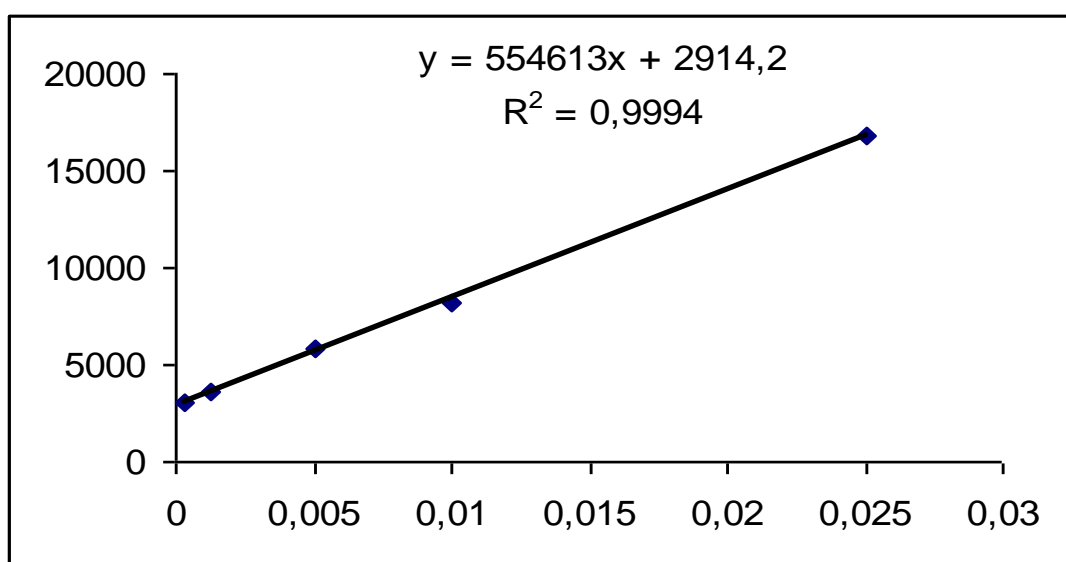


Figure. IV.4 Courbe d'étalonnage du détecteur pour la spiramycine.

IV.2.3. Application au dosage pharmaceutique

Une fois que toutes les variables d'analyse ont été ajustées et que la courbe d'étalonnage a été mise en place, nous sommes entrains de procéder au dosage de macrolide présent dans les médicaments sélectionnés.

Les rendements de dosage ont été calculés d'après la courbe d'étalonnage concernée. Les valeurs de ces rendements sont présentées dans les tableaux suivants :

Tableau IV.6 Rendement : changement de variables de l'érythromycine en milieu pharmaceutique.

Macrolide	Echantillons	Méthode d'HPLC proposée			
		ERY		% C _{theo}	100%
Erybesan®	P%		101,81	97,92	98,37

Tableau IV.7 Rendement : changement de variables de la spiramycine en milieu pharmaceutique.

Macrolide	Echantillons	Méthode d'HPLC proposée			
		Spi		% C _{theo}	100%
Rovamyne®	P%		98,55	100,92	97,99

D'après ces résultats (Tableau IV.6 et Tableau IV.7), les rendements sont compris entre 97,0 et 102,0 % pour les deux macrolides. En peut conclure que, la méthode présente des bons rendements et peut être utilisée comme outil pour le contrôle de qualité pharmaceutique.

B- Etude en milieu biologique

IV.2.4. Méthode d'analyse

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient uniquement de la substance à analyser. Dans le but de vérifier cette propriété, nous avons analysé deux types d'échantillons :

- 3) Echantillons des filets de Tilapia rouge dopés par les deux macrolides.
- 4) Echantillons des filets de Tilapia (Noir et rouge) traités par l'érythromycine.

Les échantillons de Tilapia sont extraits par la méthode d'extraction mentionnée ci-dessus[50]. L'extrait de chaque échantillon a été filtré à l'aide d'un filtre de membrane de 0,45µm et puis, 20µl de cette solution ont été prélevés et injectés dans la colonne analytique de notre système chromatographique. Les chromatogrammes des solutions injectés ont été enregistrés dans les conditions opératoires déjà cité.

IV.2.5. Application au dosage biologique

L'estimation des rendements de l'extraction des analytes (ERY et SPI) pour les deux types d'échantillons étaient déterminées par le calcul des taux de récupération (ρ %) sur l'intervalle de dosage testé et en utilisant les courbes d'étalonnages et les paramètres mesurés par HPLC. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans les tableaux IV.8-9. Les valeurs obtenues de ρ (%) se situaient entre 50,0 et 80,0 % et ont été jugées satisfaisantes.

Les chromatogrammes obtenus sont représentés par les figures en annexe, montrent que notre méthode de dosage permet de faire la distinction entre la substance à analyser (ERY et SPI), la matrice biologique, les impuretés et/ou les produits apparentés. En effet, on démontre que ces composés additionnels n'influencent pas sur la sélectivité. Si on compare les résultats obtenus avec des échantillons enrichis de macrolide, on remarque qu'ils n'ont pas présenté de pics aux temps de rétention des étalons. On peut donc conclure qu'il n'y a aucune interférence.

Tableau IV.8 Rendement : changement de variables d'échantillons dopés par les macrolides.

Macrolide	Système chromatographique N° 1			
	C _{theo} (500 µg)	100%	75%	50%
ERY	P%	71,92	62,84	64,57
SPI	P%	74,71	67,56	68,71
Macrolide	Système chromatographique N° 2			
	C _{theo} (500 µg)	100%	75%	50%
ERY	P%	73,24	61,11	69,88
SPI	P%	75,43	64,63	70,09


Tableau IV.9 : Rendement : changement de variables d'échantillons traités par les macrolides.

Système chromatographique N° 1				
Echantillon N°	01	02	03	04
ERY(ρ%)	71,54	77,02	51,45	50,67
Echantillon N°	05	06	07	08
SPI(ρ%)	53,83	53,11	00	75,71
Système chromatographique N° 2				
Echantillon N°	01	02	03	04
ERY(ρ%)	70,33	72,40	50,87	50,04
Echantillon N°	05	06	07	08
SPI(ρ%)	55,17	50,28	00	74,99

D'après ces résultats de cette étude, la méthode montre des bons rendements et exactitude sur la gamme des concentrations sélectionnée. Donc, la méthode d'HPLC utilisée est adéquate pour l'étude quantitative en milieu biologique.

IV.3. Conclusion

Notre travail consiste à développer une méthode chromatographique d'HPLC sensible, pour le dosage de l'érythromycine et de la spiramycine. L'étude de critère de rendements a donné de bons résultats, ce qui signifie que, la méthode HPLC utilisée est performante et capable pour la détermination quantitative de ces macrolides. Le dosage en milieux pharmaceutique des macrolides sélectionnés, a montré qu'il n'y a aucune interférence avec les impuretés et les produits apparentés existants. D'après les résultats obtenus, on peut confirmer que la méthode reste utile pour le dosage en milieux pharmaceutique et biologique de des antibiotiques de macrolides.



***Conclusion
Générale***

Conclusion Générale

Dans ce mémoire, nous avons optimisé la détection et la quantification de deux macrolides à savoir ; érythromycine (ERY) et spiramycine (SPI) en milieux pharmaceutique (Erybesan® et Rovamyne®) et biologique (Poissons de Tilapia).

Premièrement, pour l'étude spectroscopique par UV, l'optimisation de la détection en UV nous a conduits à étudier l'effet de plusieurs paramètres sur la réaction de dérivation chimique entre ERY, SPI et NQ. Les valeurs obtenues de réponses sont très suffisantes. Ces résultats peuvent être résumés dans les points suivants :

- L'influence du solvant, (L'eau pour les deux macrolides ERY et SPI).
- Le volume du réactif NQ, (1,5mL pour les deux macrolides ERY et SPI).
- Le volume d'hydroxyde de sodium, NaOH, (1mL pour ERY et 1,5L pour SPI).
- Le temps (15,0 min pour les deux macrolides ERY et SPI).
- La température (25°C pour les deux macrolides ERY et SPI).

En deuxième lieu, pour le dosage chromatographique par HPLC, nous avons fixé les conditions chromatographiques suivantes :

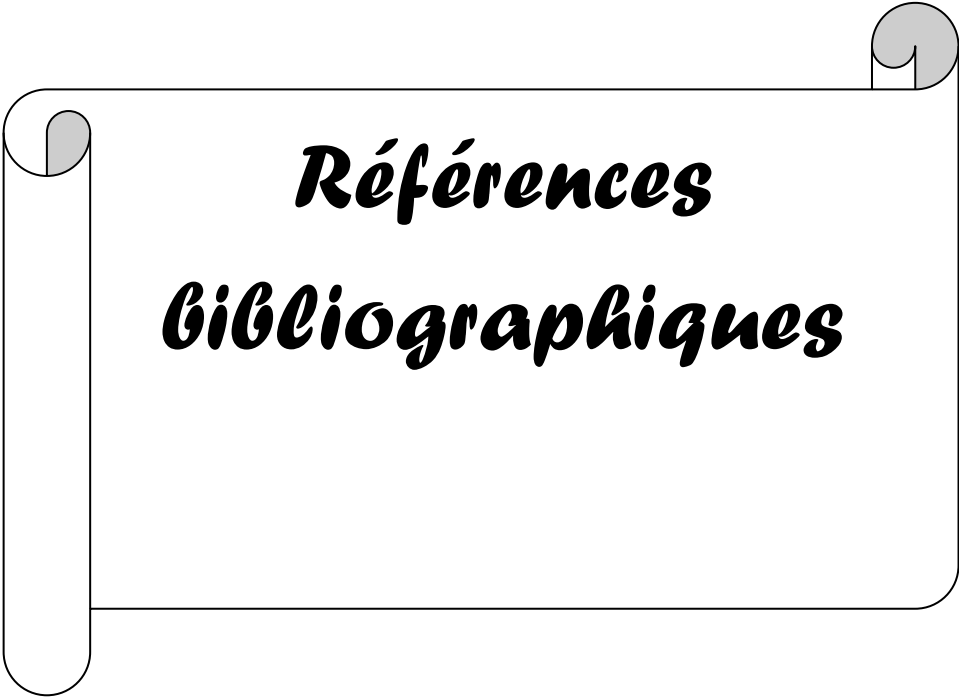
- Phase mobile.....ACN/2-méthyle-2-propanol/ K_2HPO_4 de 0,025M à pH 6,5 (33 :7 :60, v/v/v).
- Colonne..... ODB RP 18.
- Longueur d'onde (UV)..... 215nm pour ERY et 232nm pour SPI.
- Volume injecté.....20 μ l.
- Débit1,0 mL/min.
- Température de la colonne25°C.

L'analyse quantitative des analytes en milieu pharmaceutique est validée en vérifiant le paramètre de linéaire, qui est le plus important dans l'estimation quantitatif. Vu aux résultats obtenus, nous avons constaté que, les pourcentages de rendements ont de bonnes valeurs ($\geq 50,0\%$) dans les deux milieux et pour les deux macrolides. Il a été constaté que, cet antibiotique peut être pris globalement avec une précision acceptable et que les résultats obtenus par les deux méthodes analytiques sont très encourageants et montrent une bonne détermination quantitative. Cependant,

ils se caractérisent par légères différences dans les valeurs obtenues dans certains cas, et cela est dû aux spécificités de chaque technique.

En regardant les résultats obtenus, nous constatons que la méthode ultraviolette est efficace, en raison de sa dépendance aux valeurs exactes tirées de l'appareil UV. Par contre, la méthode chromatographique par HPLC est couramment utilisée, en raison de leurs simplicités et de leurs rapidités pour le dosage des antibiotiques, mais elle est un peu coûteuse.

En conclusion, nous disons que chaque méthode dépend aux ses caractéristiques qui la distinguent. Donc, on peut dire que les deux méthodes (Spectrophotométrie UV et HPLC) sont efficaces pour Le dosage d'érythromycine (ERY) et de spiramycine en milieux pharmaceutique et biologique.



***Références
Bibliographiques***

Références bibliographiques

- [1] S. Torch, D. Benseguil, Pharmacologie spéciale, Institut des sciences vétérinaires, Université des Frères Mentouri Constantine 1, 2020.
- [2] D. Yala, AS. Merad, D. Mohamedi, M. NourKorich, *Medicine du Maghreb*, N° 91, 2001.
- [3] Présentation des antibiotiques, le manual MSD, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/infections/antibiotiques/-aminosides>
- [4] R. Drihem, C. Boukbir, H. Boukryata, I. Boukeloua, Analyse quantitative en milieu pharmaceutique d'un produit thérapeutique par deux méthodes différentes (microbiologique et spectrophotométrique), Mémoire de Master, Université de Skikda, 2022.
- [5] MT. Ben Moussa, Pharmacognosie, Cours de 3^{ème} année pharmacie, Université de Batna2, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <http://pharmacie.univ-batna2.dz/cours-troisi%C3%A8me-ann%C3%A9e>
- [6] Familles d'antibiotiques, Médicalisâtes, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Famille_d_antibiotiques.pdf
- [7] P. Pistre, Effet d'une liste de vérification sur la thérapie antimicrobienne au centre hospitalier de l'université de Montréal, Mémoire du diplôme d'études spécialisées de sciences pharmaceutiques, Université de Lorraine, 2017, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : http://docnum.univ-lorraine.fr/public/BUPHA_T_2017-_PISTRE_PAULINE.pdf
- [8] Macrolides, Pharmaco-médicale, consulté le : 12 Avril 2023, Disponible sur : https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Famille_d_antibiotiques.pdfhttps://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Famille_d_antibiotiques.pdf
- [9] Erythromycine et néo macrolides actuels, usages cliniques et perspectives, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2001/revue-medicale-suisse-2369/erythromycine-et-neomacrolides-actuels-usages-cliniques-et-perspectives>
- [10] P. Ragree, S. Ben Youssef, Les macrolides, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://docplayer.fr/>
- [11] S. Omura (Ed.), *Macrolide antibiotics, chemistry, biology, and practice*, 2eme ed., Academic Press, London, 2002.

- [12] Erythromycine: Indications, effets secondaires, c'est quoi ?, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-medicaments/2799883-erythromycine-indications-effets-secondaires/>
- [13] Macrolides et apparentés, Erythromycine (Erythromycine A), consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : http://untori2.crihan.fr/unspf/2014_Rennes_Tomasi_Macrolides/co/ErythromycinErythromycine_A_.html
- [14] Erythromycin, Utilisations, Effets secondaires, Interactions, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://ressourcessante.salutbonjour.ca/drug/getdrug/nu-erythromycin-s>
- [15] Guides médicaux, Érythromycine orale, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://medicalguidelines.msf.org/fr/viewport/EssDr/francais/erythromycine-oral-16684913.html>
- [16] Dictionnaire français, Définition de spiramycine, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.lalanguefrancaise.com/dictionnaire/definition/spiramycine>
- [17] Spiramycine : substance active à effet thérapeutique, Vidal , consulté le : 10 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/spiramycine-3329.html#:~:text=La%20spiramycine%20est%20un%20antibiotique,R%20%3E%204%20mg%2F1.>
- [18] Spiramycine : tout savoir sur l'utilisation de cet antibiotique, consulté le : 10 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.sante.fr/antibiomalin-pour-savoir-comment-bien-utiliser-les-antibiotiques/spiramycine>
- [19] Indications des macrolides, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://medicament.ooreka.fr/astuce/voir/520591/macrolides>
- [20] Votre pharmacie en ligne française, Médicaments, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.pharma-gdd.com/fr/tout-savoir-sur-lesmedicament>
- [21] Le site du service public d'information en santé, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.sante.fr>
- [22] Vidal, La base de référence sur les médicaments, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.vidal.fr/medicaments.html>
- [23] Médicament : Quelle différence entre le nom commercial et le nom générique?, consulté le : 11 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.futura-sciences.com/>

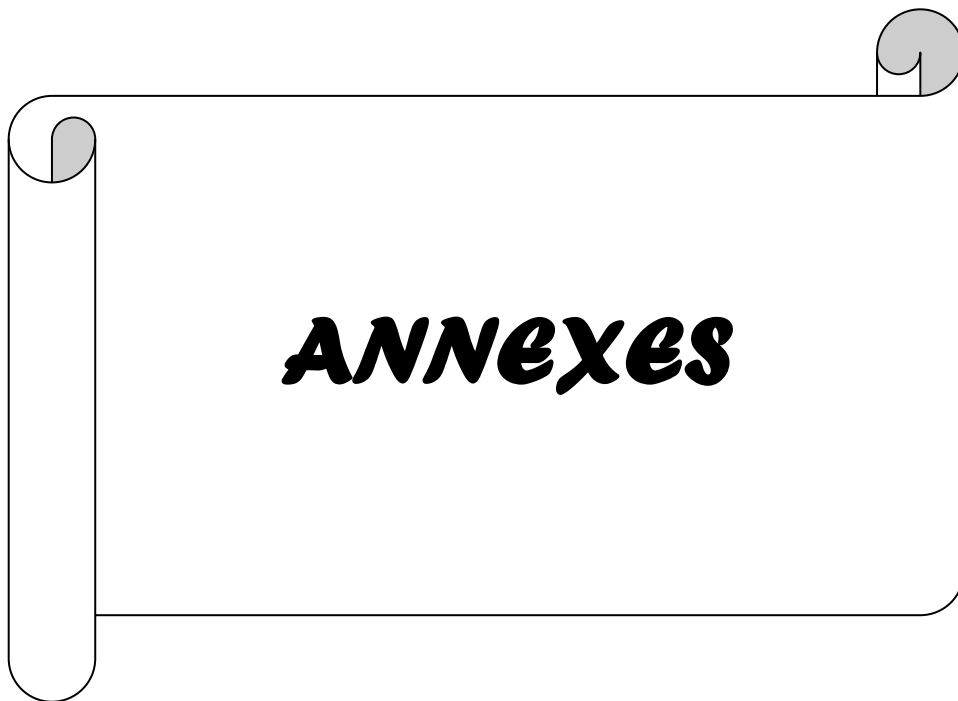
- [24] S. [Shalini, R. Lynch](#), Conception et développement du médicament, le manuel MSD, consulté le : 11 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.msmanuals.com>
- [25] Guide des médicaments, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : https://www.doctissimo.fr/asp/medicaments/medicaments_loupe.htm
- [26] Gaucher France, Quelles sont les étapes du développement d'un médicament ? consulté le : 11 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.gaucherfrance.fr>
- [27] Le cycle de vie du médicament, Giropharm, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.giropharm.fr/conseils-sante/le-cycle-de-vie-du-medicament#:~:text=Elle%20est%20%C3%A9galement%20appel%C3%A9e%20principe,sa%20commercialisation%20pendant%2020%20ans.>
- [28] Dénominations des médicaments, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : <https://www.inflamoeil.org/l-inflammation/traitements/article/denominations-des-medicaments>
- [29] chromatographie, Larousse, consulté le : 14 Avril 2023, Disponible sur : [:https://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/chromatographie/33792](https://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/chromatographie/33792)
- [30] N. Boutaghane, Les techniques Chromatographiques, cour de techniques d'analyses, Disponible sur : [:https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/BCM/2020/cours%20Techniques%20d'analyses%20BOUTAGHANE.pdf](https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/BCM/2020/cours%20Techniques%20d'analyses%20BOUTAGHANE.pdf)
- [31] Manipulations en laboratoire, la chromatographie, consulté le : 26 Avril 2023, Disponible sur : [:https://planetvie.ens.fr/thematiques/manipulationsenlaboratoire-/lachromatographie?fbclid=IwAR1ce99_IUaBVHJygABaQ1VzD708AuYF4QYf2Wd1OyqPbQFZx7NHugO390Y.](https://planetvie.ens.fr/thematiques/manipulationsenlaboratoire-/lachromatographie?fbclid=IwAR1ce99_IUaBVHJygABaQ1VzD708AuYF4QYf2Wd1OyqPbQFZx7NHugO390Y.)
- [32] HPLC principe et appareillage, Séries STL biotechnologies, consulté le : 26 Avril 2023, Disponible sur : [:https://sms-bse-bgb.ac-normandie.fr/HPLC-Principe-et-appareillage.](https://sms-bse-bgb.ac-normandie.fr/HPLC-Principe-et-appareillage.)
- [33] Quels sont les avantages de la chromatographie liquide à haute performance sur GC?, consulté le : 26 Avril 2023, Disponible sur : <http://fr.scienceaq.com/Chemistry/100104868.html>
- [35] G. Burgot, J. Burgot, Méthodes instrumentales d'analyse chimiques et applications, 2^e édition, Lavoisier, Paris, 2006.
- [34] A. Meyer, D. Denier, Spectroscopie pratique dans le domaine du visible et de l'ultraviolet, Bull. Un. Phys. 784 (1996) 895 – 908.
- [35] A. Rouessac, F. Rouessac, Analyse clinique: Méthodes et techniques instrumentales modernes, 5^{ème} Edition, Dunod, Paris, 2000.

- [36] Principes, techniques de l'ingénieur, consulté le : 26 Avril 2023, Disponible sur : [https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/spectrometrie-atomique-et-spectrometrie-moleculaire-42707210/spectrophotometrie-d-absorption-dans-l-ultraviolet-et-le-visible-p2795/principes-p2795v2niv10001.html#:~:text=Le%20principe%20de%20la%20spectrom%C3%A9trie,\(400%2D800%20nm\).](https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/spectrometrie-atomique-et-spectrometrie-moleculaire-42707210/spectrophotometrie-d-absorption-dans-l-ultraviolet-et-le-visible-p2795/principes-p2795v2niv10001.html#:~:text=Le%20principe%20de%20la%20spectrom%C3%A9trie,(400%2D800%20nm).)
- [37] Tout savoir sur le spectre ultraviolet-visible, consulté le : 26 Avril 2023, Disponible sur : https://www.superprof.fr/ressources/scolaire/physique-chimie/terminale-s/la-spectroscopie/spectrometrie-ultravioletvisible.html?fbclid=IwAR1ce99_IUaBVHJygABAq1VzD708AuYF4QYf2Wd1OyqPbQFZx7NHugO390Y.
- [38] Cours, de Spectrophotométrie UV-Visible, consulté le : 26 Avril 2023, Disponible sur : https://elearn.univ-tlemcen.dz/pluginfile.php/117764/mod_resource/content/1/Cours_M1-g%C3%A9o_ressources_technique%20dnalyses.pdf
- [39] Tout savoir sur la spectrophotométrie, Techniques de l'ingénieur, consulté le : 26 Avril 2023, Disponible sur : https://www.techniquesingenieur.fr/glossaire/spectrophotometrie?fbclid=IwAR0r9-HO_x5eIV6roGXy9H63CuvscPfSywtt3Bvy_Bh9ViVaUaSrvFjXGcl
- [40] J. Voyer, J. Dubard, J. Hameury, J-R. Filtz, Etalonnage en transmission spectrale de filtres pour lecteur de micro- plaque Elisa, Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), Division optique, Trappes Cedex, 2011.
- [41] I. Kanfer, M.F. Skinner, R.B. Walker, Analysis of macrolide antibiotics, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 255–286.
- [42] H.Y. Wang, L.X. Xu, Y. Xiao, J. Han, Spectrophotometric determination of dapsone in pharmaceutical products using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic as the chromogenic reagent, *J. Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 60 (2004) 2933–2939.
- [43] A.H. Darwish, S.M. Amer, L.I. Al-Rayes, Spectrophotometric study for the reaction between fluvoxamine and 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate: kinetic, mechanism and use for determination of fluvoxamine in its dosage forms, *J. Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 72 (2009) 897–902.
- [44] S. Ebraheem, A.A. Elbashir, H.Y. Aboul-Enein, Spectrophotometric methods for the determination of gemifloxacin in pharmaceutical formulations, *Acta. Pharm. Sin. B* 1 (2011) 248–253.

- [45] A.A. Elbashir, A.A. Ahmed, S.M.A. Ahmed, H.Y. Aboul-Enein, 1,2-Naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt (NQS) as an analytical reagent for the determination of pharmaceutical amine by spectrophotometry, *Appl. Spectrosc. Rev.* 47 (2012) 219–232.
- [46] A.A. Elbashir, A.S.M. Ahmed, H.Y. Aboul-Enein, New spectrofluorimetric method for determination of cephalosporins in pharmaceutical formulations, *J. Fluoresc.* 22 (2012) 857–864.
- [47] A.A. Elbashir, H.E.A. Elwagee, Spectrophotometric determination of pyrimethamine (PYM) in pharmaceutical formulation using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS). *J. Assoc. Arab Univ. Basic Appl. Sci.* 11 (2012) 32–36.
- [48] M. Irandoust, M. Shariati-Rad, M. Khodabakhshi, Development of a spectrophotometric method for determination of cephalexin using sodium 1, 2-naphthoquinone-4-sulfonate and central composite design, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 5 (2014) 97–103.
- [49] J. Paesen, K. Khan, E. Roets, J. Hoogmartens, Study of the stability of erythromycin in neutral and alkaline solutions by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene), *Int. J. Pharm.* 113 (1994) 215–222.
- [50] A. Lassoui, M. Naghouache, I. Rouag, A. Selougha, Dépistage de résidus d'antibiotique dans la chair de Tilapia (*Oreochromis* sp) « Méthode Physico-chimique », Mémoire de Master, Université de Skikda, 2022.
- [51] P. Edder, L. Coppex, A. Cominoli, C. Corvi, Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection, *Food. Additives. Contaminants.* 19 (2002) 232–240.
- [52] P. Hubert, J.J. Nuyen-Huu, B. Boulanger et al ; " Validation des procédures analytiques quantitatives", Edition S. Pharma. Prat, (2003), p 101-138.
- [53] P. Jonvel ; « Le guide d'assurance Qualité et de Traçabilité », Edition Merck-Clevalnot, Paris (1996), p 109-141.
- [54] P. Dehouck, Y.V. Heyden, J.S-Verbeke et al ; Interlaboratory study of a liquid chromatography method for erythromycin: determination of uncertainty, *J. Chromatogr. A*, (2003) 1010, 63–74.
- [55] P. Chaminade, S. Feraud, A. Baillet et D. Ferrier ; « Validation d'une Méthode Analytique de Dosage par CLHP » Edition. S. Pharma Prat (1995), p 17-35.

[56] J.Vial, I.Menier, A.Jardy, P.Amger, A.Brun and L.Burbaud ; How to better define the characteristics of dispersion of results in liquid chromatographic analyses through an interlaboratory study: Example of collaborative studies, *J. Chromatogr B*, (1998) 708, 131–143.

[57] G. Mahuzier, M. Hamon, *Chimie analytique: méthodes de séparation*, Tome 2, Edition Masson, Paris, 1990.



ANNEXES

Partie d'HPLC

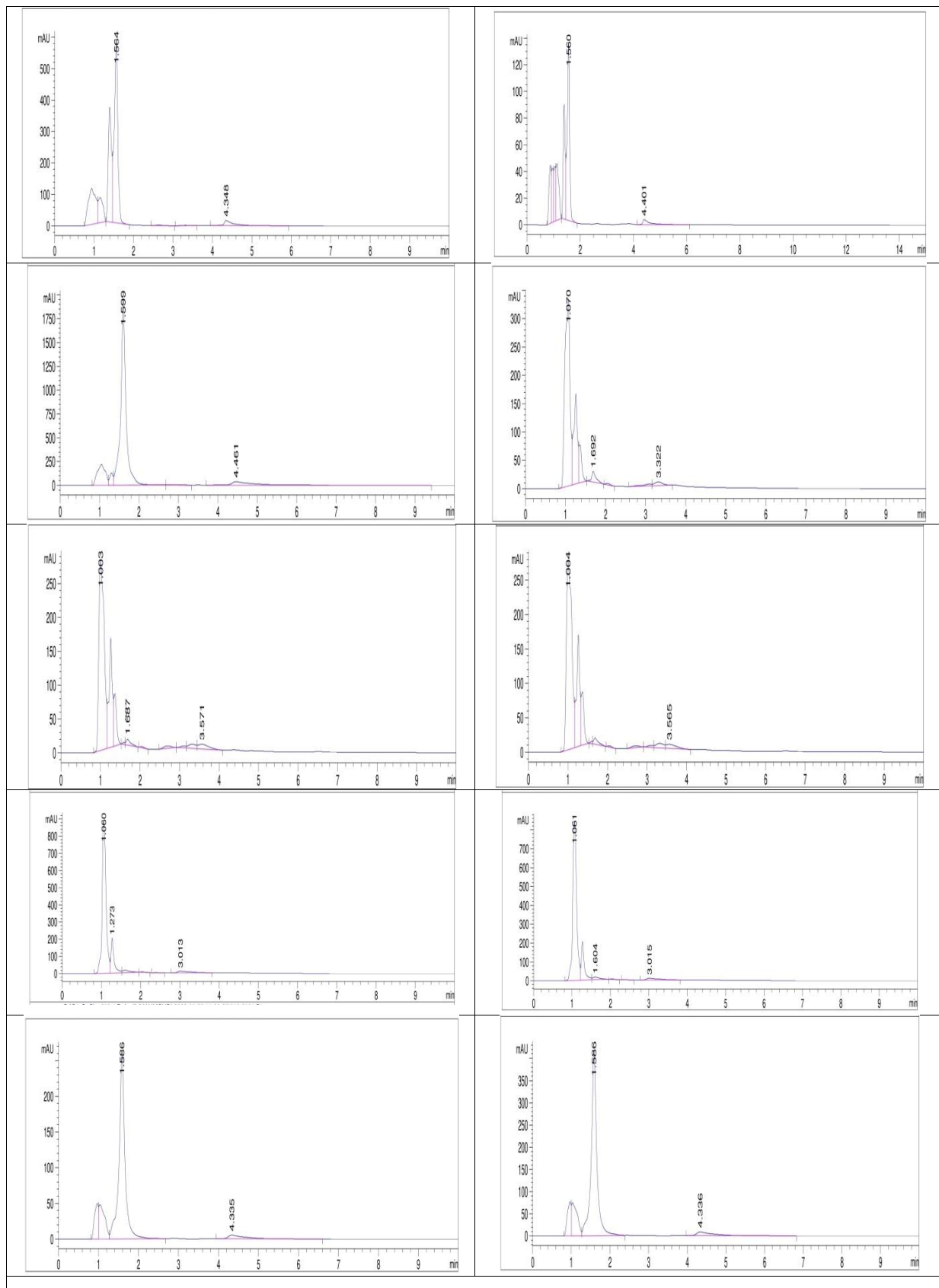


Figure A.1 Chromatogrammes obtenus en appliquant le système chromatographique N° 1.

Partie de spectrophotométrie



Figure B.1 Solutions utilisées.

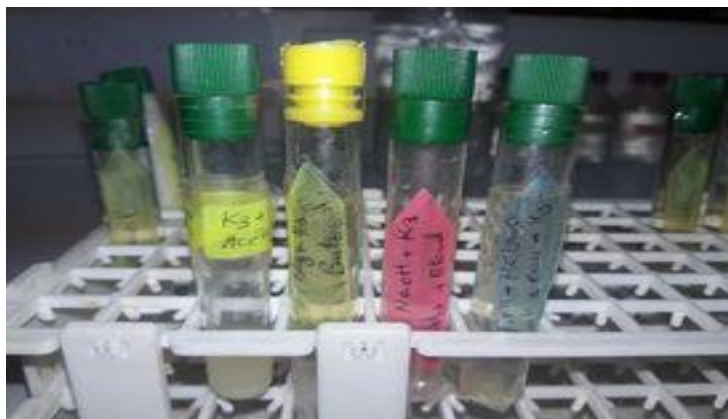


Figure B.2 Influence de la nature du solvant.



Figure B.3 Effet de la concentration du NQ2.



Figure B.4 Influence du milieu alcalin (NaOH)



Figure A.6 Appareille d'UV-Visible.



Figure A.7 Appareil d'HPLC.

Résumé :

Les macrolides ont des médicaments de la classe des antibiotiques. Il existe plusieurs types de macrolides, dont l'érythromycine et la spiramycine sont les plus utilisés pour traiter un certain nombre d'infections bactériennes. Dans ce cadre, la présente étude décrit le développement de deux méthodes en utilisant la méthode spectrophotométrique et la technique chromatographique d'HPLC, pour la détermination quantitative de ces deux macrolides en milieu pharmaceutique et biologique.

En premier, une méthode spectrophotométrique UV a été utilisée pour le dosage de ces deux macrolides en se basant sur la formation des complexes entre l'antibiotique et le NQ en milieu alcalin à 25 °C avec une détection à 258 nm. La loi de Bèer-Lambert a été respectée dans la gamme de concentrations allant de 15 à 55 µg/mL.

En second lieu, une méthode d'HPLC a été utilisée pour le dosage des macrolides dans en milieu pharmaceutique et biologique. Cette étude a été réalisée en utilisant une colonne C18 à 25 °C, et une détection en UV à 215 nm (érythromycine) et à 232 nm (spiramycine). Les résultats des deux méthodes étaient acceptables et indiquant leurs performances pour l'analyse des macrolides.

Abstract:

Macrolides are antibiotic class of drugs. There are several types of macrolides, of which erythromycin and spiramycin are the widely used for the treatment of certain bacterial infections. In this context, the present study describes the development of two procedures using the spectrophotometric method and HPLC chromatographic technique for the quantitative determination of both macrolides in pharmaceutical and biological media.

First, a UV spectrophotometric method was developed for the determination of these macrolides based on the formation of complexes between the antibiotic and the NQ in an alkaline medium at 25°C with detection at 258 nm. The Beer-Lambert law was respected in the concentration range from 15 to 55 µg/mL.

Secondly, an HPLC method was used for the quantitation of macrolides in pharmaceutical and biological media. This study was carried out using a C18 column at 25°C, and UV detection at 215 nm (erythromycin) and at 232 nm (spiramycin). The results of both methods were acceptable and indicated of their performance for macrolide analysis.

Keywords: macrolide, erythromycin, spiramycin, HPLC, UV

ملخص :

الماكروليدات هي أدوية من فئة المضادات الحيوية. هناك عدة أنواع من الماكروليدات، منها الإريثروميسين والسيبراميسين الأكثر استخدامًا لعلاج عدد من الالتهابات البكتيرية. في هذا السياق، تصف الدراسة الحالية تطوير طريقتين باستخدام طريقة القياس الطيفي والتقنية الكروماتوغرافية لـ HPLC، من أجل التحديد الكمي لهذين الماكروليدتين في الوسائط الصيدلانية والبيولوجية.

أولاً، تم استخدام طريقة القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية لتحديد هذين الماكروليدتين بناءً على تكوين معقدات بين المضاد الحيوي و NQ في وسط أساسي عند 25 درجة مئوية مع الكشف عند 258 نانومتر. تم احترام قانون بير-لامبرت في نطاق التركيز من 15 إلى 55 ميكروغرام / مل.

ثانياً، تم استخدام طريقة HPLC لتقدير الماكروليدات في الوسائط الصيدلانية والبيولوجية. أجريت هذه الدراسة باستخدام عمود C18 عند 25 درجة مئوية، والكشف عن الأشعة فوق البنفسجية عند 215 نانومتر (الإريثروميسين) وعند 232 نانومتر (سيبراميسين). كانت نتائج كلتا الطريقتين مقبولة ودلت على أدائهما الجيد في تحليل الماكروليدات.