

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR AGRICOLE
E7-1 ANALYSES ET CONTRÔLES**

Option : ANABIOTEC

Durée : 180 minutes

Matériel(s) et document(s) autorisé(s) : **Calculatrice**

Le sujet comporte **7** pages

SUJET

SOLUTION D'ANTIBIOTIQUE INJECTABLE

Une entreprise pharmaceutique spécialisée dans la production d'antibiotiques met en place la fabrication d'une solution d'amoxicilline injectable générique (**document 1**).

Cette préparation est utilisée dans le traitement des infections bactériennes sévères (infections respiratoires, génitales, urinaires...).

Ce médicament se présente sous la forme d'un flacon de poudre d'amoxicilline (principe actif) et d'un flacon de solvant, contenant, notamment de l'eau « pour préparation injectable », nommée eau « ppi ». Ses caractéristiques sont présentées dans le **document 2**.

Au sein du laboratoire de contrôle qualité de cette entreprise, vous êtes en charge de la validation du procédé de fabrication ainsi que des lots d'antibiotiques fabriqués, conformément à la Pharmacopée Européenne.

On étudie la production du solvant, puis le dosage du principe actif et enfin, la masse des flacons de poudre.

PARTIE 1 : Production du solvant (11 points)

L'eau « ppi », composant principal du solvant, présente des caractéristiques imposées par la Pharmacopée Européenne et indiquées dans le **document 2**.

1-1 Justifier le choix des critères de qualité attendus pour l'eau « ppi ».

Le procédé de fabrication du solvant est présenté sur le **document 3**.

1-2 Elaborer, sous la forme d'un tableau, un plan de contrôle à mettre en place pour valider la fabrication du solvant. Pour chaque point de contrôle, préciser notamment la technique proposée et la fréquence du contrôle.

On contrôle la conductivité de l'eau « ppi » à l'aide d'un capteur placé au niveau de la cuve de stockage de cette eau.

1-3 Plusieurs mesures sont effectuées. La moyenne des résultats obtenus est de $500 \pm 10 \text{ nS.cm}^{-1}$ à 20°C. Conclure sur cette mesure de la conductivité.

1-4 Proposer une méthode pour contrôler la stérilité de ce solvant. Etablir un logigramme de la manipulation.

1-5 L'apyrogénicité est vérifiée par le « Limulus test ». En vous appuyant sur le **document 4**, concevoir le protocole de ce test.

PARTIE 2 : Contrôle de la poudre d'amoxicilline (7 points)

On dose le principe actif, l'amoxicilline, par HPLC, sur le produit fini réhydraté avec les 20 mL de solvant. L'objectif est de vérifier la concentration d'amoxicilline dans le médicament avant injection.

2-1 Justifier les conditions expérimentales de ce dosage en vous aidant du **document 5**.

2-2 Indiquer la technique permettant de choisir la valeur de la longueur d'onde pour la détection.

Une gamme d'étalonnage a été élaborée entre 0 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'amoxicilline.
Les résultats de cette gamme d'étalonnage sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Aire du pic (unité arbitraire)
0	0
20	58544
40	117011,7
60	175632,7
80	234154,7
100	286059,7

2-3 Vérifier la validité de la linéarité de la méthode.

Donnée : le coefficient de corrélation « r » doit être supérieur à « $r_{\text{lim}} = 0,9955$ » pour valider la linéarité de droite.

r_{lim} est une donnée interne au laboratoire.

2-4 Une limite supplémentaire au niveau de l'étalonnage aurait pu être recherchée.
Indiquer cette limite et son intérêt.

Les limites de détection et les limites de quantification de la méthode sont précisées ci-dessous :

Limite de détection ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,4139
Limite de quantification ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,2545

2-5 Indiquer les informations apportées par leur détermination.

2-6 A partir des données du **document 1**, de la gamme d'étalonnage et des données ci-dessus, indiquer la technique de préparation de l'échantillon d'amoxicilline réhydraté à doser et préciser la démarche vous permettant de déterminer l'aire du pic attendu.

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquence de petites variations des paramètres internes à la méthode. Elle a été contrôlée en modifiant uniquement le débit de la phase mobile. Deux valeurs ont été choisies : 0,9 et 1,1 mL.min^{-1} .

2-7 Présenter l'intérêt de valider la robustesse d'une méthode.

Citer d'autres paramètres pouvant être contrôlés pour vérifier la robustesse de la méthode HPLC.

PARTIE 3 : Contrôle de la masse des flacons de poudre (2 points)

Le laboratoire souhaite vérifier la conformité de la masse de chaque flacon de poudre produit. L'entreprise s'est fixé une valeur de conformité de masse égale à $5,00 \pm 0,05$ g (1g d'amoxicilline et 4g de flacon).

La doseuse est considérée comme opérationnelle, si au plus 2,2 % des flacons sont non conformes.

Afin d'évaluer l'efficacité des réglages de la doseuse, on effectue un contrôle en prélevant un échantillon de 250 flacons de poudre. Sur cet échantillon, on a dénombré 15 flacons de poudre non conformes.

La taille de la production est supposée suffisamment grande pour que ce prélèvement puisse être assimilé à 250 tirages successifs avec remise.

3-1 Au seuil de risque de 5 %, ce contrôle remet-il en question les réglages faits par le laboratoire ?
(Document 6).

DOCUMENT 1

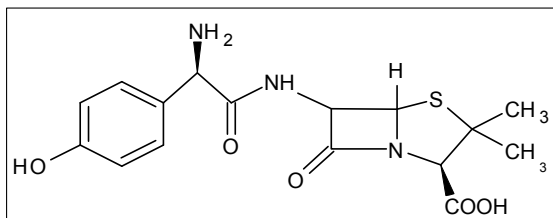
Solution injectable d'amoxicilline

D'après www.vidal.fr, consulté le 3/11/2015

L'amoxicilline est un antibiotique qui appartient à la famille des pénicillines à spectre élargi, c'est-à-dire actives sur un plus grand nombre de germes que la pénicilline simple.

Formule brute : $C_{16}H_{19}N_3O_5S$

Formule développée :



Masse molaire : $365,404 \pm 0,021 \text{ g.mol}^{-1}$.

Cet antibiotique est utilisé dans le traitement de diverses maladies infectieuses, notamment des poumons, des bronches, du nez, de la gorge ou des oreilles, de l'appareil digestif ou urinaire, des voies génitales, des gencives et des dents.

Présentation du médicament injectable (formulation pour adulte)

Flacon de 1g de poudre d'amoxicilline.

Ampoule de solvant de 20mL.

Composition du médicament injectable

Flacon de poudre :

Amoxicilline 1 g

Ampoule de solvant :

Potassium 32,96 mg
Eau ppi Qsp 20 mL

(Qsp = « Quantité suffisante pour »)

L'eau « ppi » est une eau « pour préparation injectable », obtenue par double distillation d'une eau osmosée.

Mode d'emploi et posologie du médicament injectable

La solution injectable est obtenue en dissolvant le flacon de 1g de poudre avec les 20mL de solvant fourni. Une légère coloration de la solution est normale.

Ce médicament est réservé à la voie intraveineuse et doit être injecté lentement : 3 minutes au minimum.

Posologie usuelle

Elle est strictement individuelle. Déterminée par le médecin, elle varie en fonction des indications.

DOCUMENT 2

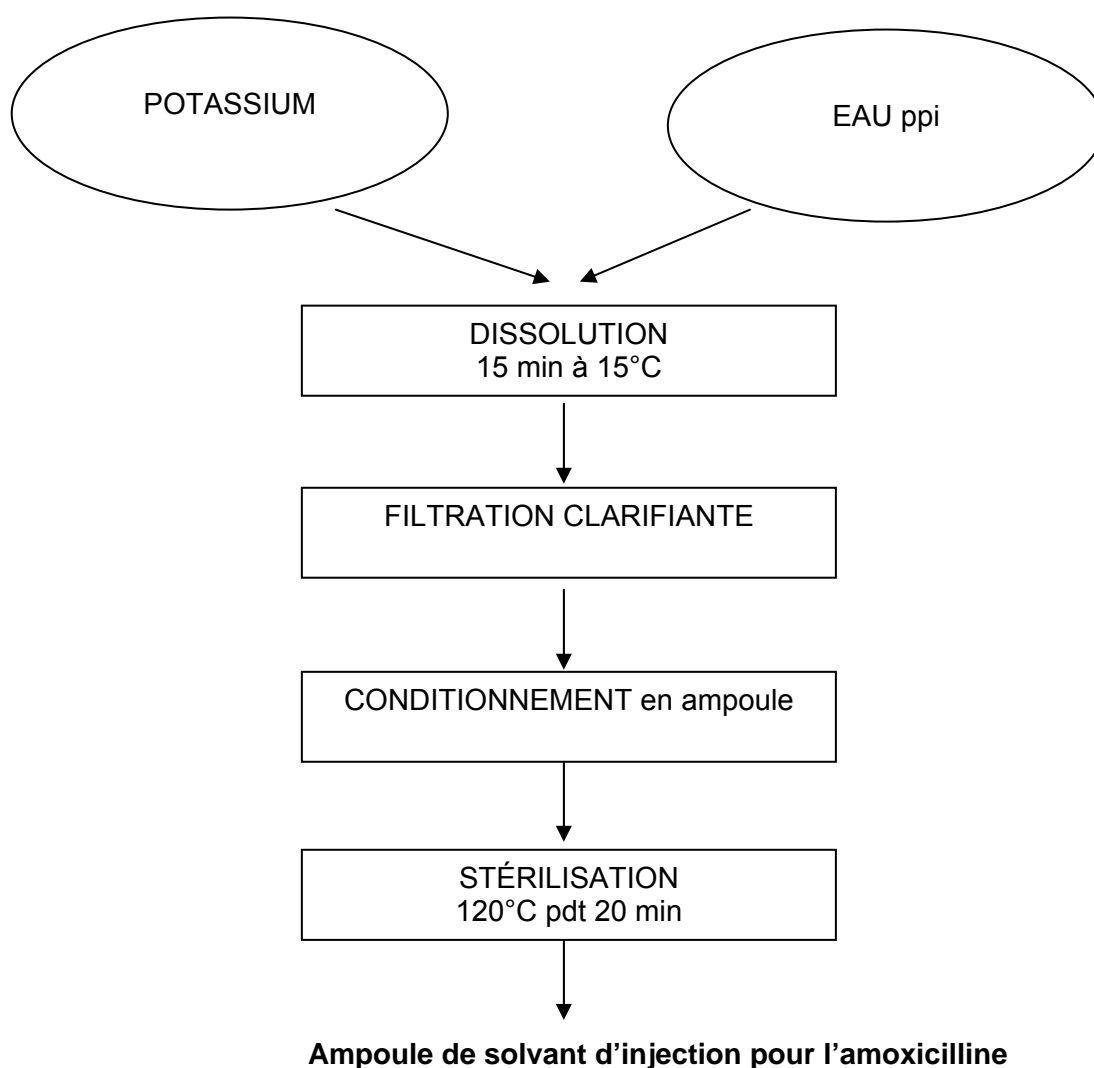
Qualité requise pour l'eau pour les préparations injectables

D'après la Pharmacopée Européenne 01/2005

Conductivité	$\leq 1,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 20°C
Nombre de germes viables totaux	$< 1 \text{ UFC } / 100 \text{ mL}$
Endotoxines bactériennes (apyrogénicité)	$< 0,250 \text{ UE}\cdot\text{mL}^{-1}$
Particules en suspension	Absence

DOCUMENT 3

Diagramme de fabrication du solvant



DOCUMENT 4

Le Limulus test

D'après le fournisseur CAPE COD

Introduction

Les normes de la pharmacopée imposent l'absence de substances pyrogènes dans les produits pharmaceutiques qui entrent en contact avec la circulation sanguine ou le système nerveux central. Ces composés sont généralement des endotoxines des bactéries Gram-. Ils provoquent une augmentation de la température induisant des maux de tête, nausées...Parfois, une hypotension peut être déclarée responsable de mortalité.

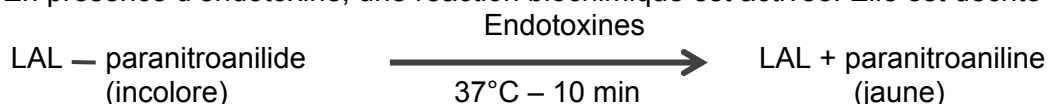
Les endotoxines sont difficiles à éliminer car elles sont thermostables. Aussi, une eau, même stérile, peut contenir des endotoxines à l'état de trace.

Principe

Le limule (*Limulus polyphemus*) ou « crabe en fer à cheval » possède des cellules sanguines appelées amoebocytes.

Le test utilise un lysat d'amoebocytes limules noté LAL. Un substrat chromogénique, la paranitroanilide est fixé sur le LAL.

En présence d'endotoxine, une réaction biochimique est activée. Elle est décrite de la façon suivante :



La paranitroaniline, composé jaune, absorbe à 405 nm.

La sensibilité du test est égale à 0,005 UE.mL⁻¹ (UE = Unité d'Endotoxine)

Matériel et réactifs requis

Matériels

- Microplaques
- Incubateur
- Micropipette de différents calibres
- Lecteur de microplaques

Produits

- Eau stérile sans substance pyrogène
- Solution mère d'endotoxines à 2,0 UE.mL⁻¹
- Pyrochrome (LAL couplé avec la paranitranilide)
- Acide acétique à 50%
- Contrôle positif à 0,25 UE.mL⁻¹
- Contrôle négatif
- 1 échantillon à doser

Indications pour les conditions opératoires

Le test est réalisé sur une microplaque.

Une gamme étalon d'endotoxines est réalisée. Les concentrations recommandées sont les suivantes : 1,0 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 UE.mL⁻¹

Les produits sont mélangés volume à volume.

Après la distribution du pyrochrome, l'incubation est réalisée. Puis, l'addition de l'acide acétique stoppe l'action des endotoxines sur le pyrochrome.

DOCUMENT 5

Développement et validation de l'amoxicilline par RP-HPLC

D'après International Journal of Chem Tech Research, volume 3, N°3, p1037, July-Sept 2011

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Une chromatographie isocratique liquide à haute pression (HPLC Shimadzu winchrome - Série ES) avec un LC-10 AT VP pompes, avec détecteur UV/VIS SPD-10A VP, CTS-10 en tant que four à colonne (Shimadzu), et un Hypersil C-18 (colonne 250 mm x 4,6 mm, taille des particules 5 µm), a été utilisée.

REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES

Tous les produits chimiques utilisés et l'eau osmosée sont de qualité HPLC.

CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

La phase mobile est composée de dihydrogénophosphate de potassium et de méthanol dans le rapport (95:5 v/v). pH = 7.

La phase mobile a été filtrée à travers un filtre à membrane de 0,45 µm et soumis à une sonication pendant 15 min.

Le débit de la phase mobile a été maintenu à 1,0 mL.min⁻¹. La température de la colonne a été fixée ambiante et la détection a été effectuée par un détecteur UV à la longueur d'onde de 254 nm.

Le temps d'exécution a été fixé à 10 min et le volume de la boucle d'injection à 20 µL. Avant l'injection de la solution de médicament, la colonne a été équilibrée pendant au moins 30 min avec la phase mobile circulant à travers le système.

DOCUMENT 6

Valeurs critiques de la distribution de la loi normale centrée réduite

Seuil pour un test unilatéral								
	0,25	0,15	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0005
Seuil pour un test bilatéral								
	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	0,001
Z	0,6745	1,0364	1,2816	1,6449	1,9600	2,3263	2,5758	3,2906