

Manuel

Accompagnant le GPHF-Minilab[®]

Volume II

TESTS DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE



Une organisation caritative créée et sponsorisée
par Merck, Darmstadt · Allemagne

VOLUME II • TESTS DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Rédigé par

Richard W. O. Jähnke

avec la participation de

Peter Pachaly, Peter N. Gobina, Andreas Schuster, Oliver J. Nigge, Kornelia Dwornik, Volker Rubeau,
Natalia Davydova, Sanford Bradby, Mustapha Hajjou, Abdelkrim Smine et Souly Phanouvong

Remerciements à

The United States Agency for International Development (USAID) pour son soutien financier et l'assistance technique
fournie par l'équipe de The United States Pharmacopeia Drug Quality and Information (USP DQI) programme

* * *

Publié par le

Global Pharma Health Fund (GPHF)

Une organisation caritative créée et sponsorisée par Merck, Darmstadt · Allemagne

* * *

Mise à jour 2008

* * *

Copyright © GPHF

* * *

Merck, Darmstadt · Allemagne

Merck est une entreprise chimique et pharmaceutique internationale dont l'origine remonte à 1668. Merck gère ses activités sous l'égide de Merck KGaA cotée à la Bourse de Francfort. Aujourd'hui, 30% environ du capital actionnaire de la société appartient au domaine public; la famille Merck détient un intérêt de 70%. Merck développe ses activités dans deux domaines principaux - la pharmacie et la chimie.

L'activité pharmaceutique comprend les médicaments délivrés sur ordonnance, pour le traitement du cancer, les troubles neurologiques et du développement, les maladies cardiovasculaires et la stérilité, par exemple. Ce secteur inclut aussi une large diversité de marques grand public.

Le secteur d'activités chimiques offre des produits chimiques pour des applications particulières, tels les cristaux liquides pour écrans, les pigments pour l'industrie et la cosmétique, les réactifs analytiques et les équipements pour tests ainsi que des produits et services destinés à l'ensemble des processus liés à l'industrie pharmaceutique et biochimique.

En 2007, Merck et l'Organisation Mondiale de la Santé à Genève ont signé un accord de partenariat visant à contrôler la bilharziose des écoliers africains. Sur la base de cet accord, Merck fera don de 200 millions de comprimés de 600 mg de praziquantel (Cesol® 600) – une quantité suffisante pour traiter environ 27 millions d'enfants dans les dix prochaines années. Cette initiative a vu le jour parallèlement à l'établissement du Global Pharma Health Fund à Francfort, une organisation caritative sponsorisée en exclusivité par Merck et destinée à améliorer les structures sanitaires et médicales dans les pays en voie de développement. Le GPHF-Minilab® agit en tant que défense de première ligne contre les médicaments contrefaits et de qualité substandard menaçant la santé de millions de personnes dans les pays en voie de développement.

* * *

Réalisé par Grimm Grafik Design

Table des Matières

Chapitre	Page
1 Introduction	5
2 Santé & Sécurité	9
3 Inspection Visuelle	10
4 Test de Désintégration	13
5 Test de Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	14
5.1 Principe fondamental	14
5.2 Phase stationnaire	15
5.3 Phase mobile	16
5.4 Préparation d'échantillon	17
5.5 Dépôt d'échantillon	21
5.6 Développement du chromatogramme	23
5.7 Révélation de taches	24
5.8 Résultat et mode d'explication	27
5.9 Retarding factor (valeur R _f)	28
5.10 Analyse des erreurs d'échantillon et essai	29
5.11 Nettoyage et élimination	30
6 Procédures Individuelles des Tests	31
6.1 Acide acétylsalicylique (Aspirine)	32
6.2 Aminophylline	36
6.3 Amodiaquine (de base et chlorhydrate)	40
6.4 Amoxicilline	44
6.5 Ampicilline	48
6.6 Artéméther* Nouveau	52
6.7 Artésunate	56
6.8 Céfalexine	60
6.9 Chloramphénicol	64
6.10 Chloroquine (en tant que phosphate et sulfate)	68
6.11 Ciprofloxacine	72
6.12 Cloxacilline	76
6.13 Didanosine	80
6.14 Erythromycine (de base et stéarate)	84
6.15 Ethambutol*	88
6.16 Furosémide	92
6.17 Glibenclamide	96
6.18 Griséofulvine	100
6.19 Indinavir	104
6.20 Isoniazide*	108
6.21 Lamivudine*	112
6.22 Luméfantrine*	116
6.23 Mébendazole	120
6.24 Méfloquine	124
6.25 Métronidazole	128
6.26 Névirapine*	132
6.27 Oséltamivir Nouveau	136
Suite de la table des matières page suivante	

6.28	Paracétamol	140
6.29	Phénoxyméthylpénicilline (pénicilline V)	144
6.30	Praziquantel Nouveau	148
6.31	Prednisolone	152
6.32	Primaquine (en tant que diphosphate).....	156
6.33	Pyrazinamide*	160
6.34	Quinine (y compris toutes les formules salines communes)	164
6.35	Rifampicine*	168
6.36	Salbutamol	172
6.37	Stavudine*	176
6.38	Sulfadoxine (y compris les formules avec de la pyriméthamine)	180
6.39	Sulfaméthoxazole (y compris les formules du cotrimoxazole).....	184
6.40	Tétracycline	188
6.41	Zidovudine*	192
7	Tableau Synoptique des Procédures de Test CCM	196
8	Procédures d'Echantillonnage	199
9	Formulaires de Rapport.....	201
10	Liste des Articles d'Inventaire pour le Minilab Spécialisé en CCM	205
11	Illustration d'Assemblage pour le Minilab Spécialisé en CCM	208

* y compris les présentations composées de plusieurs agents actifs



1 Introduction

L'apparition de produits pharmaceutiques contrefaits et la propagation de médicaments de qualité substandard a été identifiée au niveau international et représente un danger sérieux pour la santé. Ce phénomène s'observe avant tout dans les pays en voie de développement dont les structures institutionnelles concernant les règlements, l'inspection et l'application des lois sont déficitaires et où les fonds nécessaires à un contrôle régulier de la qualité des médicaments sont insuffisants. La contrefaçon de produits pharmaceutiques peut adopter différentes formes mais lorsqu'ils sont administrés à un patient, les conséquences varient de l'erreur de traitement à l'augmentation de toxicité, une résistance accrue de médicament au paludisme, à la tuberculose et au SIDA, allant même jusqu'au décès immédiat comme suite à un des effets nommés ci-dessus.

On estime une présence de médicaments contrefaits se situant à 1 pour cent des ventes dans les pays développés et à 10 pour cent dans les pays en voie de développement, suivant la région géographique. En Afrique, dans certaines régions d'Asie et d'Amérique latine, 30% des médicaments en vente peuvent être contrefaits dans certaines régions. Par contre, d'autres marchés en voie de développement comptent moins de 10% de médicaments contrefaits ; on peut estimer dans l'ensemble une base de contrefaçon se situant entre 10 et 30%. Si l'on considère les médicaments antipaludéens, antibactériens et autres médicaments de lutte contre les infections, un seul cas isolé peut suffire à exposer au danger des vies par milliers. Des antipaludéens contrefaits, sans aucun effet et ne contenant aucune substance médicamenteuse envahissent déjà les marchés en Asie du Sud-Est. La confiance des patients dans les institutions de santé publique diminue considérablement.

Besoin d'utilisation du GPHF-Minilab®

En raison du danger largement répandu de contrefaçon de médicaments, le contrôle de qualité dans le système de distribution des pays en voie de développement a acquis de nouvelles dimensions aujourd'hui. Si le respect de

Besoins de tests de contrôle de qualité de médicaments dans les pays à bas revenus à chaînes de distribution pharmaceutique incomplète et à prévalence de médicaments contrefaits

Niveau	Lieu du test	Echelle de test	But du test
1	Service sanitaire, détaillant rural, consommateurs etc.	Examen visuel: inspection de la forme galénique, d'étiquetage et d'emballage	Détection de médicaments contrefaits avant consommation
2	Hôpitaux, magasins de produits pharmaceutiques, programmes de maladies prioritaires, commerçants de gros, importateurs, etc.	Test de base: réactions colorées, chromatographie en couche mince, désintégration	Contrôle post marketing, aide quand les labos entièrement équipés ne sont pas disponibles, ne fonctionnent pas correctement etc.
3	Laboratoires régionaux et nationaux, laboratoires privés indépendants, labos industriels etc.	Test complet selon des codex pharmaceutiques et autres méthodes légales autorisées	Inspections avant et après l'expédition, tests de médecine légale pour actions en justice etc.

bonnes conditions de fabrication pharmaceutique, la distribution et la pratique commerciale ne peuvent être assurées, un plus grand nombre d'échantillons doit être testé afin de maintenir une assurance de qualité appropriée de médicaments. Dans le même temps cependant, les analyses de pharmacopée sont devenues toujours plus coûteuses et seuls certains centres de standard élevé dans certains pays sont en mesure de les réaliser. Le développement et l'utilisation de tests simples devraient faciliter dorénavant l'établissement d'un équilibre entre d'un côté, le besoin d'augmenter la pratique de tests de médicaments et d'un autre, le maintien de coûts peu élevés.

Le Global Pharma Health Fund (GPHF), une organisation caritative créée et gérée par Merck, Darmstadt · Allemagne, a commencé à développer et fournir un minilaboratoire portable, adapté aux tropiques et simple d'utilisation pouvant vérifier l'identité et le contenu des médicaments et donc détecter les médicaments contrefaits par l'emploi de techniques analytiques de coût peu élevé. Le GPHF-Minilab® pourrait combler les lacunes concernant les procédures de tests de qualité de médicaments dans les pays où les moyens pour un contrôle de qualité effectif ne sont pas encore entièrement mis en place ou là où les tests

complets sont coûteux, difficiles d'accès et demandent beaucoup de temps.

Le GPHF-Minilab® permettra aux structures sanitaires responsables de l'achat, du stockage et de la distribution de médicaments de se protéger de la menace du commerce dangereux de médicaments contrefaits. La gestion des cas de contrefaçon représente une partie du travail. Le rapport des cas s'effectue par un acte délibéré. Quand il a été informé, le GPHF peut signaler les médicaments contrefaits mais ne peut effectuer de propres enquêtes. Quand des médicaments contrefaits ou substandards ont été identifiés, certains services sanitaires peuvent décider de ne pas régler la facture, d'autres peuvent choisir de changer de fournisseur sans le faire savoir. Les minilabs n'ont pas le pouvoir d'arrêter les trafiquants. Cependant, ils contribuent à engager des enquêtes complémentaires et préservent de façon immédiate les patients contre les traitements avec des médicaments contrefaits inefficaces. Et finalement, le fait que le délit puisse être découvert même dans les régions rurales éloignées peut avoir un effet dissuasif pour les personnes raisonnables impliquées dans le délit et de cette façon, mettre fin à la prolifération de médicaments contrefaits.

Monographies par classe thérapeutique: liste actuelle d'applications du GPHF-Minilab® établie pour les médicaments destinés à lutter contre les grandes maladies prioritaires (paludisme, TB et SIDA) et les maladies du domaine pédiatrique

Classe thérapeutique	Substances médicales individuelles
Antalgiques	acide acétylsalicylique, paracétamol
Antiasthmatiques & antiinflammatoires	aminophylline, prednisolone, salbutamol
Antibactériens	amoxicilline, ampicilline, céfalexine, chloramphénicol, ciprofloxacine, cloxacilline, érythromycine, métronidazole, phénoxyéthylpénicilline, sulfaméthoxazole, tétracycline, triméthoprime
Antifongiques	griséofulvine
Anthelminthiques	mébendazole, praziquantel
Antipaludiques	amodiaquine, artéméter, artésunate, chloroquine, luméfántrine, méfloquine, primaquine, pyriméthamine, quinine, sulfadoxine
Antituberculeux	éthambutol, isoniazide, pyrazinamide, rifampicine
Antiviraux	didanosine, indinavir, lamivudine, névirapine, oséltamivir, stavudine, zidovudine
Autres	furosémide, glibenclamide

Applications du GPHF-Minilab®

Le GPHF-Minilab concentre son travail sur un ensemble de plus de quarante médicaments mettant immédiatement la vie en danger quand ils sont dilués. Ils ont été sélectionnés en tenant compte des méthodes de prescriptions actuelles, de l'intérêt de la santé publique et des rapports de cas de contrefaçon; la liste actuelle contient les antimicrobiens, anthelminthiques, anti(rétro)viraux, antipaludiques, antituberculeux communs et quelques autres médicaments. Des extensions de ces méthodes de test à d'autres composants actifs sont possibles. Quand des versions contrefaites ont été détectées à l'aide du Minilab, des inspecteurs de produits pharmaceutiques, des hôpitaux, des entrepôts pharmaceutiques nationaux et autres distributeurs en matière de santé peuvent geler des lots de contrefaçon pour une protection immédiate de patients et envoyer des échantillons supplémentaires à des laboratoires de contrôle de qualité de médicaments entièrement équipés pour des tests de confirmation.

Contenu du GPHF-Minilab®

Les GPHF-Minilabs contiennent des produits de laboratoire et produits chimiques essentiels, ainsi que des comprimés et gélules authentiques dans un but de référence. Les livraisons contiennent des quantités suffisantes permettant de réaliser jusqu'à un millier de tests et garantissent des coûts matériels totaux pour un test individuel ne dépassant pas deux euros. Deux coffrets robustes contiennent les composants essentiels – un ensemble

complet de verrerie laboratoire pour l'extraction et la préparation d'échantillons, la saisie en pipettes et le dépôt de taches, des feuilles chromatographiques à haute performance, des cuves de développement et de révélation, des lampes à UV de différentes longueurs d'ondes, une plaque chauffante, une lampe à pétrole, des tubes à essais, des règles à calibrage et des récipients de stockage. Ils comprennent aussi des crayons et des stylos. Si besoin est, une balance de poche numérique peut être ajoutée sans

problèmes. Une collection complète de substances témoin pour plus de quarante composants actifs et un jeu de manuels fournissant des procédures d'opérations simples sont d'une importance toute particulière. Rédigé dans un langage non scientifique et riche en illustrations, ces manuels se lisent plutôt comme une recette de cuisine qu'un livret d'instructions. Ce manuel présent ainsi que le manuel de réactions colorées sont disponibles aussi en anglais et espagnol.







Coffrets GPHF-Minilabs contenant un équipement de laboratoire de base, des manuels et un ensemble complet de plus de quarante standards de référence secondaires.

Procédures de test du GPHF-Minilab®
Le GPHF-Minilab® reprend au 21^e siècle les schémas de tests de médicaments de base publiés par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) il y a quelques trente ans. De nouvelles méthodes de tests ont été introduites et il est fourni non seulement des manuels d'opération en différentes langues mais aussi un ensemble complet de matériel de laboratoire, des substances témoin et produits chimiques principaux - le tout correctement emballé pour un transport international aérien. Aujourd'hui, l'identification de médicaments contrefaits à composants

erronés, en quantité trop faible ou sans aucun composant actif peut être réalisée en tous lieux dans le monde. Les résultats obtenus au cours d'une série de tests de contrôles chimiques et physiques doivent correspondre aux exigences de l'étiquette du médicament, au moins pour ce qui concerne l'identité et la teneur en substance active. S'ils ne correspondent pas ou que les résultats ne sont pas concluants, alors les lots en question peuvent être gelés en vue d'examen ultérieurs. Les GPHF-Minilabs ne peuvent remplacer les tests extensifs concernant les questions de libération des composants, la pureté

chimique, ou la contamination microbienne; ces tests ainsi que les tests détaillés de médecine légale pour les actions en justice doivent être réalisés par un laboratoire entièrement équipé pour le contrôle de qualité de médicaments employant des méthodes légales autorisées. Le GPHF-Minilab® a été développé seulement pour vérifier rapidement la qualité de médicaments en vue d'une détection des produits contrefaits.

Le schéma de test physique et chimique du GPHF-Minilab®

Inspection visuelle	Désintégration	Réaction colorée	Chromatographie en couche mince (CCM)
			
<p>1. Un schéma d'inspection visuelle de formes pharmaceutiques solides et de matériel d'emballage correspondant pour un rejet précoce de contrefaçons à la présentation des plus primitives.</p>	<p>2. Un simple test de désintégration de comprimés et gélules afin de vérifier les déclarations d'étiquettes sur les systèmes à enrobage entérique et autres systèmes à libération modifiée.</p>	<p>3. Tests de réactions colorées simplifiés pour un contrôle rapide de toute présence de substance active dans le but de vérifier les déclarations d'étiquettes quant à l'identité.</p>	<p>4. Tests de chromatographie en couche mince simples d'utilisation pour un contrôle rapide de toute présence de substance active dans le but de vérifier les déclarations d'étiquettes quant au dosage.</p>

Exigences concernant l'équipe du GPHF-Minilab®

Une équipe de spécialistes d'analyses de laboratoire sera en mesure d'utiliser immédiatement le kit sans aide particulière. Une courte formation de rappel est parfois demandée. Les experts sont des médecins spécialisés dans le domaine de la chimie clinique, des pharmaciens possédant une expérience dans l'analyse de médicaments, ainsi que des techniciens médicaux et de pharmacie effectuant les mêmes travaux à des niveaux correspondants dans les hôpitaux de pays à bas revenus. Là, les pharmaciens préfèrent souvent être formés eux-mêmes en tant qu'instructeurs pour le Minilab réduisant ainsi le nombre de formations dispensées par ailleurs par le Global Pharma Health Fund et ses partenaires. En Afrique et Asie du Sud-Est, même le personnel de la police judiciaire et les douaniers participe

occasionnellement à des formations au Minilab. Mais celles-ci possèdent seulement un caractère informatif, en particulier quand des grandes études sur des pays sont lancées à des fins de contrôles de qualité de médicaments. De telles études le personnel administratif peut apporter un soutien pour la collecte d'échantillons et le gel dans les cas où les pharmaciens n'ont pas les moyens d'appliquer les réglementations.

Acquisition, maintenance et transport du GPHF-Minilab®

En tant que produit unique sans concurrence directe, l'acquisition de GPHF-Minilabs auprès des institutions publiques peut être réalisée sans appel d'offre, ce qui facilite les réactions rapides aux besoins des programmes de santé publique. En tant que produit assemblé pour une utilité humanitaire exclusivement, le GPHF-Mi-

nilab peut traverser les frontières avec un seul numéro de douane et quand le produit établit un partenariat avec l'Organisation des Nations Unies, les transports sont encore facilités. Les ventes à but non lucratif font des Minilabs un produit de coût abordable pour les organismes de santé non gouvernementaux privés ainsi qu'à obéissance religieuse. Ici, l'acceptation est renforcée encore par le fait que les Minilabs sont assemblés et transportés par Technologie Transfert Marburg (TTM), une organisation logistique au sein de leur propre communauté.

Technologie Transfert Marburg constitue le partenaire autorisé du Global Pharma Health Fund, responsable de l'assemblage du Minilab, de la facturation et du transport. Les offres de prix pour un Minilab standard incluant l'équipement de laboratoire, les standards de référence et les

réactifs pour les tests CCM et de réactions colorées peuvent être obtenus auprès de cette société (www.ttm-germany.de). Les offres peuvent aussi inclure les coûts de transport vers toute destination, toutefois les frais de douane ne peuvent être fixés à l'avance; il convient de s'adresser à l'institution sur place auprès du projet lui-même. Pour la maintenance du Minilab, un approvisionnement mondial de pièces de rechange est assuré par la même voie de distribution. Les Minilabs peuvent être adaptés pour répondre aux besoins de projets spécifiques, tels l'utilisation d'équipements CCM et standards de référence pour le seul contrôle de qualité de médicaments antipaludiques par exemple. Suivant la spécification, le prix peut être plus bas ou plus élevé.

Utilisateurs du GPHF-Minilab®, ressources et partenaires de projets

Les programmes de maladies de priorité de l'aide institutionnelle au développement utilisent fréquemment des Minilabs en vue de contrôler la qualité des médicaments dans les pays à paludisme, tuberculose et SIDA endémiques. Les organisations de soutien et partenaires de projets sont l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) à Genève et trois ONG principales des Etats-Unis, Management Sciences for Health (MSH), le Partnership for Supply Chain Management (PFSCM) et le Drug Quality and Information pro-

gramme de United States Pharmacopeia (USP DQI), tous basés à Washington DC. La German Technical Cooperation (GTZ) et les organisations à caractère religieux, par exemple l'Institut de Mission Médicale à Würzburg, l'organisation d'assistance pour les médicaments *action medeor* et les Médecins Allemands pour les Pays en voie de développement apportent également leur soutien. En Tanzanie, 25 Minilabs sont déjà utilisés en tant que défense de première ligne pour la protection des communautés du pays contre l'infiltration de médicaments contrefaits.

Depuis dix ans, les GPHF-Minilabs sont accessibles pratiquement et financièrement à échelle mondiale et protègent les institutions sanitaires à travers le monde contre l'infiltration de médicaments contrefaits, dangereux pour la santé et la vie. Plus de 300 unités sont en place maintenant dans 70 pays. A l'intérieur de l'International Medical Product Anti-Counterfeiting Taskforce (IMPACT) dirigé par l'OMS, les méthodes de test GPHF-Minilab sont reconnues en tant que technologie adaptée à la détection de médicaments contrefaits et à la protection des patients dans les pays en voie de développement. Grâce à ce soutien et à une documentation établie concernant la distribution mondiale et ponctuelle du Minilab dans presque toute destination dans le monde, les corps conseillers et financiers gouvernementaux

et non gouvernementaux, tels par exemple la Banque Mondiale, The Global Fund, UNDP etc. sont en mesure de fournir des subventions et autres soutiens aux programmes de contrôle de qualité des médicaments utilisant des Minilabs.

L'imagination des principales agences de financement, l'enthousiasme de la population locale, la logistique établie et l'engagement du Global Pharma Health Fund contribueront de façon décisive à poursuivre l'initiative du Minilab pour les dix années à venir. Dans ce contexte, la formation et l'éducation dans les écoles de pharmacie, chimie et médecine peuvent constituer une option supplémentaire.

Remarque importante

Les médicaments contrefaits représentent un risque pour la santé et la vie des patients. Afin d'éviter des résultats de tests erronés, susceptibles d'engendrer un danger pour les patients, il est indispensable que les instructions et tests fournis dans ce manuel soient soigneusement étudiés et scrupuleusement suivis lors du travail avec le GPHF-Minilab®



GPHF-Minilab®
Information et contact
Global Pharma Health Fund e.V.
Otto-Meißner-Straße 1
60314 Frankfurt, Allemagne
Tél.: +49-69-962387-600
Fax +49-69-962387-609
info@gphf.org, www.gphf.org

Le GPHF est une organisation caritative créée et sponsorisée par Merck, Darmstadt · Allemagne

6 Procédures Individuelles de Tests



6.33 Pyrazinamide (y compris les présentations composées)

Examen Primaire de Médicament via Inspection Visuelle & Test de Désintégration

I. INSPECTION VISUELLE

Chercher les anomalies d'étiquetage, d'emballage et de forme galénique comme il est décrit dans les chapitres d'entrée concernant les méthodes et procédés généraux. Inscrire toutes les caractéristiques du produit en utilisant le formulaire de rapport en tant que guide. Tout comprimé ou gélule contient généralement 400 ou 500 mg de pyrazinamide. Des dosages de 100 à 300 mg de pyrazinamide sont connus surtout en combinaison avec d'autres substances antituberculeuses.

II. TEST DE DESINTEGRATION

Tous les comprimés et gélules de pyrazinamide à libération rapide doivent réussir le test de désintégration tel qu'il est décrit dans les chapitres d'entrée concernant les méthodes et procédés généraux. Ils doivent se désintégrer dans l'eau à 37°C en moins de 30 minutes. Dans le cas contraire, le produit présente une anomalie majeure.

III. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

Les produits pharmaceutiques d'origine particulièrement bon marché, les produits pharmaceutiques dont les documents d'accompagnement sont incorrects ou manquants, à forme médicamenteuse ou à emballage défectueux, ou dont les étiquettes sont incomplètes, endommagées, manquantes ou écrites en langue étrangère, doivent être soumis à un examen de chromatographie sur couche mince.

Vérification d'Identité et de Teneur en Substance Active via le Test de CCM

I. PRINCIPE

La pyrazinamide est extraite des comprimés et gélules avec du méthanol et déterminée par chromatographie sur couche mince (CCM) en référence à une substance témoin. Quand elle est combinée à d'autres substances antituberculeuses, tous les composants peuvent être extraits et analysés simultanément.

II. EQUIPEMENT ET REACTIFS

- 1) Pilon
- 2) Feuille d'aluminium
- 3) Entonnoir
- 4) Bande adhésive
- 5) Stylo feutre
- 6) Crayon
- 7) Fioles de verre de 10 ml
- 8) Kit de pipettes graduées (1 à 25 ml)
- 9) Kit de flacons de verre de laboratoire (25 à 100 ml)
- 10) Plaques d'aluminium CCM Merck pré-enduites au gel de silice 60 F 254, taille 5 x 10 cm
- 11) Tubes capillaires de verre de 2 µl de capacité
- 12) Cuve chromatographique (récipient de 500 ml)
- 13) Plaque chauffante
- 14) Papier filtre
- 15) Paire de ciseaux
- 16) Paire de pincettes
- 17) Lampe UV de 254 nm
- 18) Cuve de révélation à l'iode
- 19) Méthanol
- 20) Toluène
- 21) Ammonium hydroxyde concentrée
- 22) Substance témoin, par exemple des comprimés de pyrazinamide à 500 mg

III. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN DU STOCK

Pour la préparation de la solution témoin du stock, il faut un étalon de référence, par exemple des comprimés contenant 500 mg de pyrazinamide. Envelopper un comprimé de référence dans une feuille d'aluminium et le réduire en fine poudre à l'aide d'un pilon. Verser avec précaution le contenu de la feuille d'aluminium au-dessus d'un flacon de 100 ml et faire écouler tous les résidus solides à l'aide de 50 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée. Fermer le flacon et agiter pendant trois minutes environ jusqu'à dissolution de la plupart des solides. Laisser reposer la solution pendant cinq minutes encore jusqu'à ce que les résidus non dissous se déposent au fond du flacon. La solution obtenue doit contenir 10 mg de substance active par ml et être étiquetée en tant que "Solution Témoin du Stock de Pyrazinamide". Ne préparer cette solution que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec le liquide clair ou même trouble.

IV. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN D'USAGE 100% (LIMITE SUPERIEURE)

Introduire à l'aide de la pipette graduée 1 ml de la solution témoin du stock dans un fiole de 10 ml et ajouter 7 ml de méthanol. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 1,25 mg de substance active par ml et être étiquetée en tant que "Solution Témoin d'Usage de Pyrazinamide 100%".

Cette solution témoin d'usage supérieure constitue un médicament de bonne qualité contenant 100% de pyrazinamide.

V. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN D'USAGE 80% (LIMITE INFERIEURE)

Introduire à l'aide de la pipette graduée 1 ml de la solution témoin du stock dans un fiole de 10 ml et ajouter 9 ml de méthanol. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 1,0 mg de substance active par ml et être étiquetée en tant que "Solution Témoin d'Usage de Pyrazinamide 80%".

Cette solution témoin d'usage inférieure constitue un médicament de basse qualité contenant seulement 80% de pyrazinamide comme l'indique l'étiquette du produit. Dans la recherche présente, ce niveau de teneur en substance active représente la limite la plus basse acceptable pour un produit pharmaceutique donné.

VI. PREPARATION DE LA SOLUTION ESSAI DU STOCK D'UN MEDICAMENT DECLARANT UNE TENEUR EN PYRAZINAMIDE A 100 MG L'UNITE

Prendre un comprimé complet ou une gélule entière à partir d'un produit pharmaceutique approprié prélevé en magasin ou sur le marché. Comme à l'habitude, les comprimés sont enveloppés dans une feuille d'aluminium et réduits en fine poudre. Introduire toute la poudre obtenue dans un flacon de laboratoire de 25 ml. La poudre obtenue à partir de gélule doit être introduite directement dans le flacon, ainsi que les deux parties de l'enveloppe de gélule en dernier lieu. Pour l'extraction, ajouter 10 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée, fermer ensuite le flacon et agiter pendant trois minutes environ jusqu'à dissolution de la plupart des solides. Laisser reposer la solution pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que les résidus non dissous se déposent au fond du flacon.

PYRAZINAMIDE A 300 MG L'UNITE

Prendre un comprimé complet ou une gélule entière et extraire la poudre obtenue à l'aide de 30 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée et un flacon de 40 ml en tant que récipient de solution essai du stock. Continuer à travailler comme ci-dessus.

PYRAZINAMIDE A 400 MG L'UNITE

Prendre un comprimé complet ou une gélule entière et extraire la poudre obtenue à l'aide de 40 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée et un flacon de 100 ml en tant que récipient de solution essai du stock. Continuer à travailler comme ci-dessus.

PYRAZINAMIDE A 500 MG L'UNITE

Prendre un comprimé complet ou une gélule entière et extraire la poudre obtenue à l'aide de 50 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée et un flacon de 100 ml en tant que récipient de solution test du stock. Continuer à travailler comme ci-dessus.

Toutes les solutions obtenues doivent contenir finalement 10 mg de substance active par ml et être étiquetées en tant que "*Solution Essai du Stock de Pyrazinamide*". Ne préparer ces solutions que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec les liquides clairs ou même troubles.

**VII. PREPARATION DE LA SOLUTION
ESSAI D'USAGE**

Introduire à l'aide de la pipette graduée 1 ml de la solution essai du stock dans un fiole de 10 ml et ajouter 7 ml de méthanol. Fermer, agiter la fiole et l'étiqueter en tant que "*Solution Essai d'Usage de Pyrazinamide*".

La concentration escomptée de pyrazinamide dans la solution essai d'usage est de 1,25 mg et doit correspondre à la concentration de pyrazinamide de la solution témoin d'usage supérieure produite ci-dessus.

VIII. DEPOT D'ECHANTILLON

Tracer une ligne de base parallèle et à environ 1,5 cm de l'extrémité inférieure de la plaque de CCM et déposer 2 µl de chaque solution essai et témoin comme il est montré sur la page ci-contre, en utilisant les tubes capillaires fournis.

Il est possible de déposer jusqu'à cinq échantillons sur une plaque. Contrôler l'uniformité de tous les dépôts sous une lampe UV de 254 nm. Ils doivent être ronds de forme et également répartis sur la ligne de base. Bien qu'ils puissent différer en intensité, ils ne doivent jamais différer en diamètre. Des intensités différentes sont dues aux quantités résiduelles d'excipients de comprimés ou de gélules ou à différentes concentrations de substance active dans les solutions d'échantillons. Une différence dans la taille de la tache cependant, est due à un mauvais dépôt. Répéter cette étape si les dépôts ne présentent pas de forme homogène la première fois.

**IX. DEVELOPPEMENT DU
CHROMATOGRAMME**

Introduire à l'aide d'une pipette graduée 12 ml de méthanol, 10 ml de toluène et 0,5 ml d'ammonium hydroxyde concentrée dans le récipient utilisé en tant que cuve chromatographique. Fermer la cuve et mélanger complètement. Border les parois de la cuve avec du papier filtre et attendre environ 15 minutes afin d'assurer l'équilibre de la cuve par les vapeurs de solvant. Placer avec précaution la plaque CCM chargée dans la cuve et fermer avec le bouchon à vis. Lorsque la position du front du solvant arrive à 1 cm environ de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'une plaque chauffante au besoin.

X. REVELATION DES TACHES

Sécher tous les résidus de solvant et observer la plaque par irradiation à la lumière UV de 254 nm en utilisant la lampe à piles fournie. Utiliser cette méthode de détection à des fins d'identification et de quantification. Une vérification supplémentaire de l'identité et de la teneur en substance active peut être réalisée par observation de la plaque à la lumière du jour après la coloration à l'iode.

En cas de présence d'éthambutol, colorer et révéler les taches appropriées à l'aide de ninhydrine. Les pages 26 et 90 décrivent le processus de coloration en détail. Noter que cette méthode de révélation ne permet pas de poursuivre l'observation des taches de pyrazinamide ou isoniazide à la lumière UV de 254 nm, ni des taches de rifampicine à la lumière du jour.

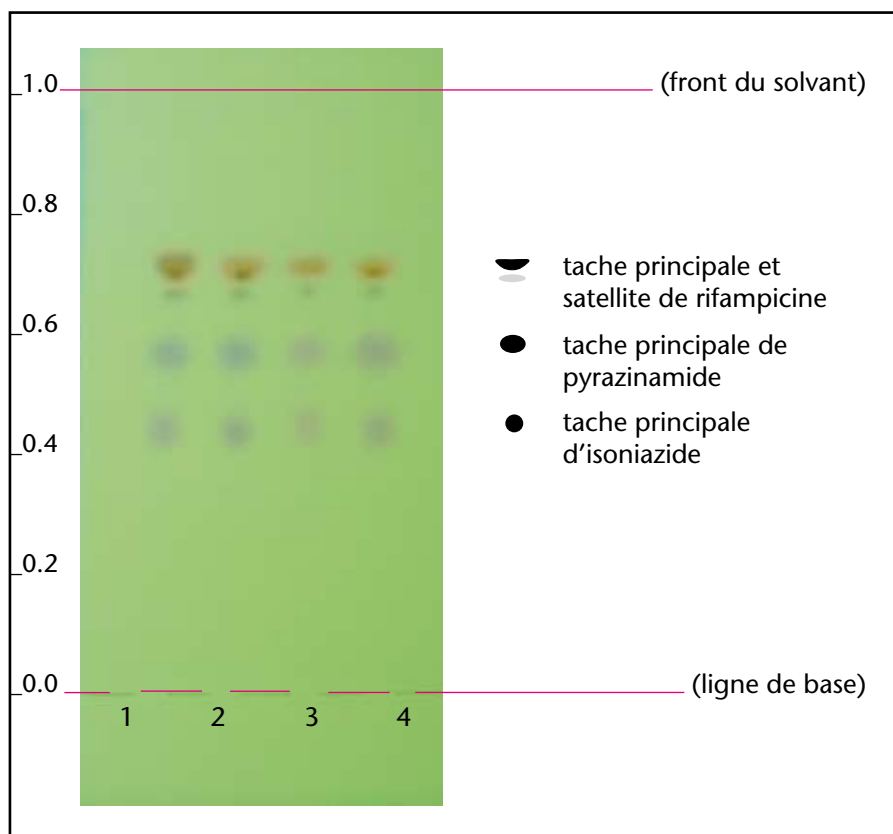
XI. CHROMATOPLAQUE OBSERVEE SOUS UNE LAMPE UV DE 254 NM

Développement n° 1:
solution témoin représentant 100% de
pyrazinamide, isoniazide et rifampicine

Développement n° 2:
solution essai représentant de pyrazina-
mide en une présentation composée de
bonne qualité

Développement n° 3:
solution essai représentant de pyrazina-
mide en une présentation composée de
basse qualité

Développement n° 4:
solution témoin représentant 80% de
pyrazinamide, isoniazide et rifampicine



XII. OBSERVATIONS A LA LUMIERE UV DE 254 NM

La présence de pyrazinamide dans la solution essai est signalée par une tache bleu-violet située à une distance de parcours d'environ 0,56. Quand la pyrazinamide est combinée à l'isoniazide et à la rifampicine, deux taches principales supplémentaires sont visibles au-dessous et au-dessus de cette tache à une distance de parcours d'environ 0,45 et 0,71, respectivement. Des taches fortes supplémentaires générées par la solution essai indiquent la présence d'autres substances actives ou une dégradation de pyrazinamide; ce dernier cas est plus probable lorsque les nouvelles taches sont accompagnées d'une tache principale plus petite. Des agents auxiliaires inclus dans les différentes formules de comprimés ou gélules peuvent générer quelques taches à peine visibles apparaissant près ou sur la ligne de base. Les produits associés contenant également de l'éthambutol nécessitent une coloration à la ninhydrine car cette substance ne peut être révélée à la lumière UV quelle que soit la longueur d'ondes.

XIII. OBSERVATIONS A LA LUMIERE DU JOUR APRES COLORATION A L'IODE

Lorsque l'on expose la chromatoplaque à la vapeur d'iode, toutes les taches de pyrazinamide déjà observées à 254 nm se colorent maintenant en un brun jaunâtre. Continuer à observer la plaque quand l'iode commence à s'évaporer. Les taches reflétant des qualités de produit moindres disparaissent d'abord, suivies progressivement des taches de référence représentant une teneur en substance active acceptable de 80 et 100 pour cent respectivement.

XIV. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

La tache de pyrazinamide du chromatogramme obtenue avec la solution essai doit correspondre en termes de couleur, de taille, d'intensité, de forme et de distance parcourue à celle du chromatogramme obtenue avec la solution témoin supérieure et inférieure. Ce résultat doit être atteint pour chaque méthode de révélation. Si ce n'est le cas, répéter le développement depuis le début avec un deuxième échantillon. Ecarter le lot si la teneur en substance active ne peut être constatée après un troisième développement. Transmettre des échantillons supplémentaires à un laboratoire de contrôle de médicaments entièrement équipé afin d'obtenir un deuxième avis. Garder des échantillons et placer le lot en quarantaine jusqu'à la prise d'une décision définitive de rejet ou de mise en circulation des médicaments.

Une organisation caritative créée et sponsorisée par
Merck, Darmstadt · Allemagne



Global Pharma Health Fund e.V. (GPHF)

Otto-Meißner-Straße 1 · 60314 Frankfurt · Allemagne
Téléphone +49-69-962387-600 · Fax +49-69-962387-609
info@gphf.org · www.gphf.org