

Manuel

Accompagnant le GPHF-Minilab®

Volume II Chromatographie en Couche Mince



Une initiative des compagnies pharmaceutiques allemandes dans le domaine de la recherche

en coopération avec



L'INSTITUT MEDICAL DE MISSION

6 Aperçu des Procédures d'Utilisation du Minilab

La valise de protection contient un grand nombre de pièces qui ne vous sont peut être pas familières. Embarrassé? Il n'y a pas lieu. Vous aurez bientôt une idée précise de ce que vous pouvez faire et de ce que vous ne devriez pas faire. Ouvrez le lot et faites vos premiers pas dans le monde du contrôle de qualité des produits pharmaceutiques. Des générations de techniciens de pharmacie ont maîtrisé ce savoir-faire avant. Nous sommes sûrs qu'il en sera de même pour vous. Bonne chance!

I. Inspection visuelle



Une règle de calibrage vous est fournie pour une description précise des tailles de comprimés et gélules pendant l'inspection visuelle. Les plaquettes à alvéoles et les emballages cartonnés sont mesurés à l'aide d'une règle graduée.

II. Test de désintégration



On effectue le test de désintégration de comprimés et gélules en utilisant un flacon à ouverture large rempli d'eau chaude (37°C). La désintégration doit être achevée lorsque l'alarme du chronomètre sonne au bout de 30 minutes.

III. CCM: 1. Préparation d'échantillon



La préparation d'une solution standard et d'une solution de test nécessite une unité entière de dosage oral solide.

Le Minilab fournit un ensemble approprié de substances secondaires authentiques suffisantes pour au moins 300 examens CCM sur des médicaments suspects. Elles sont emballées dans des lots de quinze tubes plastiques à fermeture de sécurité visible, contenant chacun 20 à 30 comprimés respectivement. Ils peuvent être commandés individuellement ou par lots complets auprès de Technologie Transfer Marburg (TTM) en Allemagne.

Remarque: Après avoir retiré un comprimé de référence ou une gélule, refermez étanchement le conteneur afin de garantir que les autres échantillons de référence ne seront pas détériorés avant leur date limite d'utilisation.



Les sachets sont vidés directement dans un flacon de verre de laboratoire à l'aide d'un entonnoir; veillez à ce que tous les résidus solides soient bien écoulés dans ce flacon à l'aide d'un volume du solvant donné.



Comme pour les sachets, les gélules de gélatine dure sont ouvertes et vidées directement au-dessus d'un flacon de verre, l'enveloppe de gélule est ajoutée au contenu.



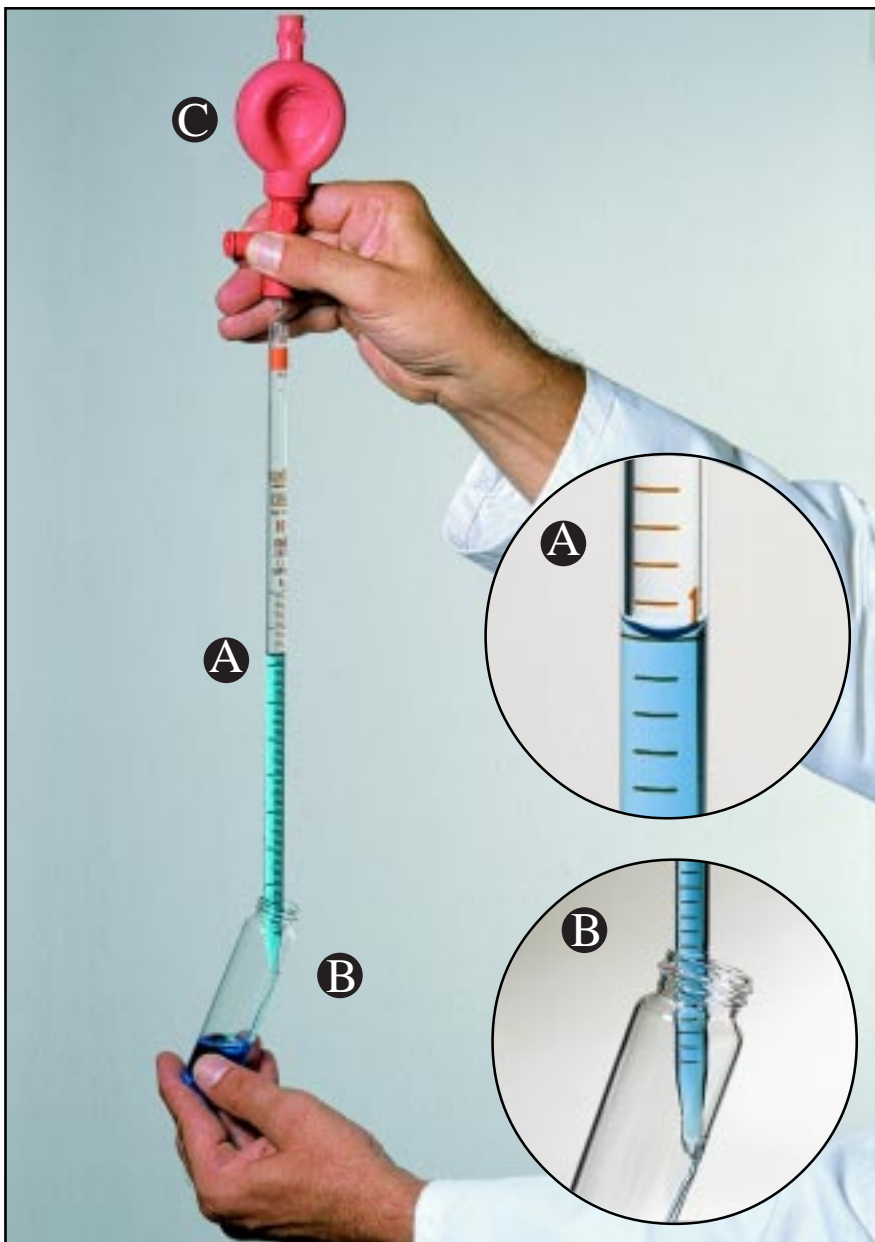
Les gélules de gélatine molle sont coupées en morceaux à l'aide d'un scalpel, d'une lame ou de ciseaux. Tous les morceaux sont introduits dans un flacon de laboratoire et les lames des ciseaux ou du scalpel doivent être rincées avec un volume donné du solvant approprié comme il est indiqué dans la monographie individuelle.



Les comprimés sont écrasés à l'aide d'un pilon avant l'extraction; il convient de procéder comme suit: enveloppez le comprimé dans une feuille d'aluminium et réduisez-le en fine poudre. Versez le contenu de la feuille d'aluminium au-dessus d'un flacon de verre de laboratoire. Rincez ensuite la feuille d'aluminium en vous assurant que le contenu entier du comprimé a été utilisé.



Tous les solides sont dissouts dans un volume donné du solvant d'extraction; on utilise à cet effet un lot de pipettes droites variées pouvant délivrer un volume précis de 0.01 à 25.0 ml du solvant. La solution obtenue constitue soit la solution standard de base ou la solution d'échantillon de base nécessitant une nouvelle dilution pour obtenir la concentration finale ou solution d'échantillon.



Maniement de pipette: Tenez la pipette en position verticale afin de vérifier que le solvant atteint la graduation désirée (A). La marque devrait se trouver sur la même ligne que le fond du ménisque formé par le solvant.

La pointe de la pipette (B) doit être tenue contre le côté intérieur du flacon.

Une petite pompe (C) est disponible également en tant qu'aide pour la pipette afin d'écarter le danger d'utilisation à la bouche.

Attention! Tous les solvants organiques sont facilement inflammables. Par conséquent, ne travaillez pas avec ceux-ci à la flamme nue ou en fumant! Tous les solvants sont toxiques. Evitez de manipuler la pipette à la bouche. Utilisez les accessoires fournis. Ne mettez pas votre santé en danger !



Utilisez le lot de pipettes droites fourni afin de diluer les solutions de base pour obtenir la concentration de travail finale.

Un lot de petits flacons de verre de 10 ml est disponible pour y verser les concentrations de travail.



Une bande d'étiquettes et un marqueur pour l'identification durable des solutions de base et de travail. Les étiquettes s'adaptent très facilement sur tout le matériel de labo de verre ou de plastique. Le marqueur est résistant à l'eau.

III. CCM: 2. Application d'échantillon



Un lot de plaquettes de chromatographie en couche mince. Celles-ci sont des plaquettes recouvertes d'aluminium, la couverture est composée d'un absorbant nommé gel de silice 60 F 254. Elles se présentent en paquets de cinquante et sont parfaitement taillées (5 x 10 cm) pour s'adapter facilement dans les chambres CCM fournies.

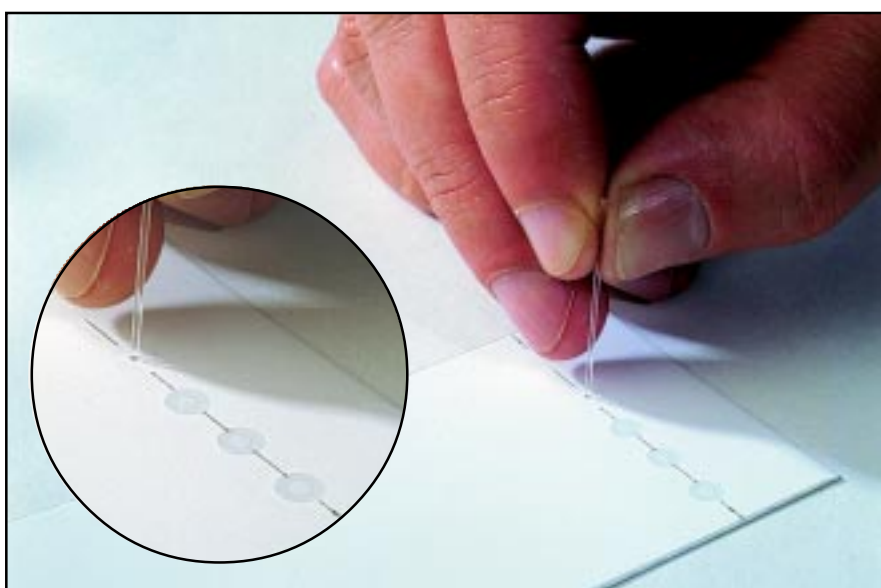
Remarque: Ouvrez l'emballage seulement avant l'utilisation. Ne retirez qu'une plaquette. Remplacez l'emballage dans la valise de protection étanche. Évitez autant que possible le contact à l'humidité. Stockez dans un endroit sec. Ne touchez pas la surface de la plaquette.



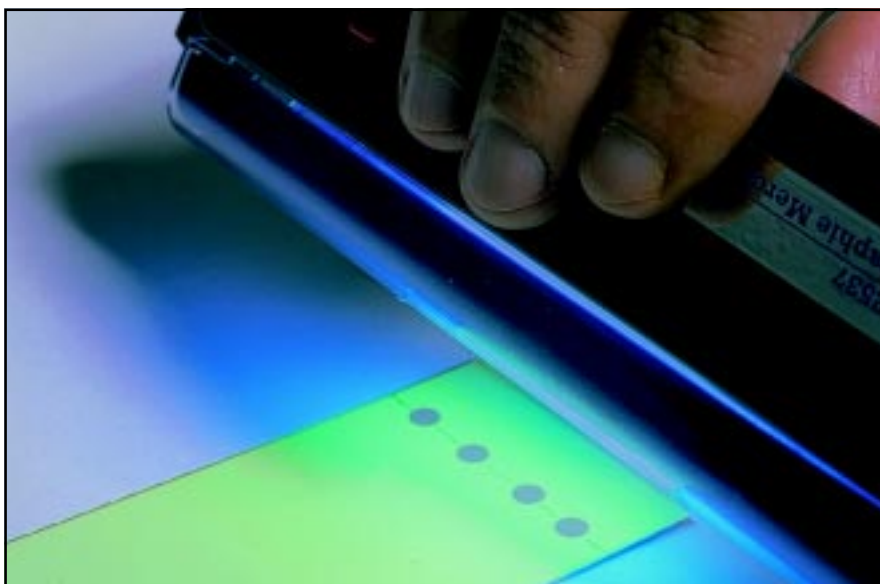
Un crayon mou et une règle sont fournis permettant le marquage de la ligne d'origine et la ligne avant sur une chromatoplaquette ainsi que la taille de la tache après le repérage au moyen des rayons ultra-violets.



Des microcapillaires de verres jetables sont fournis pour les applications d'échantillon. Ils fournissent un volume précis de 2 microlitres (μl) lorsqu'ils sont entièrement remplis d'une extrémité à l'autre.



Appliquez l'échantillon sur la ligne d'origine de la chromatoplaquette en utilisant un microcapillaire rempli de la solution de travail appropriée. Rincez le capillaire trois fois avec un solvant d'extraction (Remplir avec du solvant et évacuer à l'aide d'un filtre de papier ou tout autre tissu de papier) avant de déposer les taches de l'échantillon suivant sur la plaquette. Débarrassez-vous du capillaire lorsqu'une chromatoplaquette a été entièrement travaillée afin d'éviter le risque de contamination croisée entre les échantillons contenant des produits pharmaceutiques différents.



Contrôlez l'uniformité de toutes les taches en utilisant des rayons UV de 254 nm. Les taches deviennent visibles et toutes celles-ci devraient être rondes de forme et également réparties sur la ligne d'origine. Répétez l'étape si les taches ne sont pas réparties de façon homogène.

Remarque: Le positionnement des taches est un travail de précision et peut requérir quelque entraînement avant une exécution parfaite. Il est important de ne pas rayer la couche adsorbante car les rayures provoquent une répartition inégale et déforment les taches.

III. CCM: 3. Développement de la chromatoplaquette



Un récipient à couvercle servira de réservoir de développement. Tous les côtés du récipient doivent être doublés de papier filtre afin d'assurer la saturation de l'atmosphère du récipient avec de la vapeur du solvant avant d'ajouter les plaquettes CCM remplies pour le développement. Taillez le papier filtre de façon à ce qu'il s'adapte aisément dans le récipient. Utilisez la paire de ciseaux fournis.

Utilisez le lot de pipettes droites et de transfert fourni pour la préparation de la phase mobile: l'instrument adapté pour la répartition des taches d'échantillon le long de la plaquette CCM. Transférez tous les différents solvants dans le réservoir de développement comme il est indiqué dans la monographie individuelle et mélangez. Fermez le réservoir et attendez environ 15 minutes afin d'assurer la saturation de la chambre CCM avec la vapeur de solvant. Introduisez enfin la plaquette CCM dans le réservoir et attendez que le solvant ait progressé aux trois-quarts de la longueur de la plaquette.

Remarque: Préparez à nouveau la phase mobile pour chaque jour de travail. Ne remplacez jamais les solvants usagés dans leur réservoir d'origine!

Attention! Tous les solvants sont toxiques. Évitez de manipuler les pipettes à la bouche. Utilisez la petite pompe fournie. Ne mettez pas votre santé en danger!



Lorsque la chromatoplaquette a achevé le processus de développement, retirez-la du réservoir CCM et laissez évaporer tous les solvants en surplus. Une plaque chaude peut être utilisée afin de raccourcir le temps de séchage. Ce procédé est préférable quand la phase mobile est composée de solvants légèrement volatiles comme c'est le cas pour l'éthylacétate, le toluène ou l'eau.



Dans notre cas, un fer Philips World Travel placé à l'envers, fait office de plaque chaude. Le fer peut être utilisé en toute sécurité par tous les circuits électriques, et est alimenté par un sélecteur de voltage (110 – 240). Les fiches électriques n'étant pas les mêmes partout, une prise d'adaptation est ajoutée au minilabo.

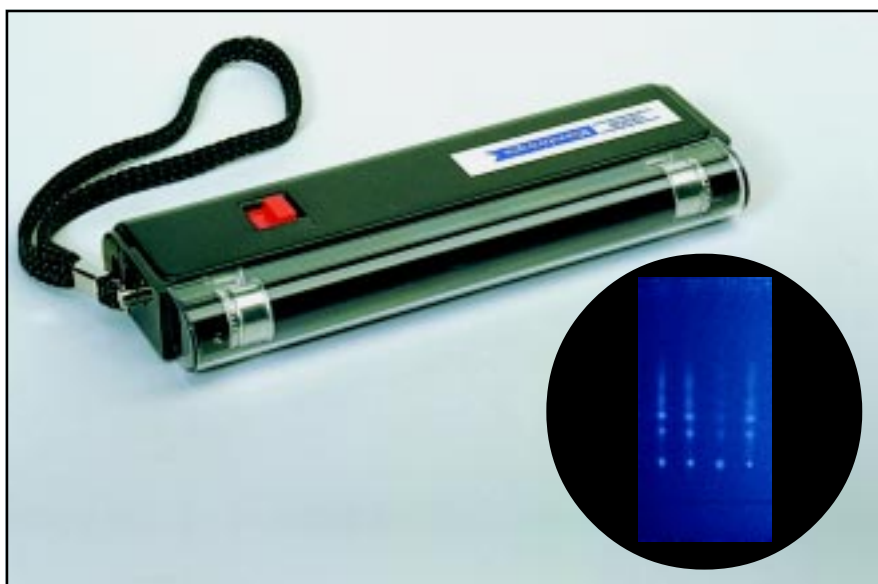
Attention! Evitez le contact direct avec la plaque chaude. Arrêtez la plaque après utilisation.

III.CCM: 4. Détection d'échantillon

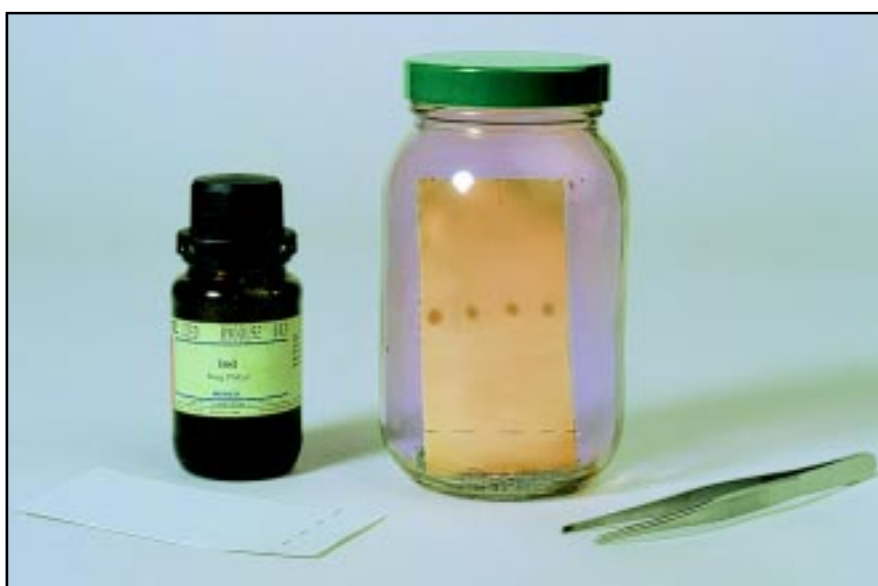


Une lampe à rayons ultra-violettes fonctionnant à piles pouvant émettre des rayons d'ondes courtes de 254 nanomètres de longueur est fournie pour la détection de taches invisibles sur l'échantillon. Placez la plaquette développée dans une pièce ou un endroit sombre (au-dessous de la table, dans un tiroir, dans une boîte ou un meuble) et exposez-la à la source de rayons ultra-violettes. Toutes les taches sensibles à cette lumière deviennent alors visibles. Marquez-les pour une évaluation ultérieure en utilisant le crayon fourni.

Attention! Ne portez pas le regard directement à la source de rayons UV pendant le fonctionnement pour éviter des blessures d'yeux.

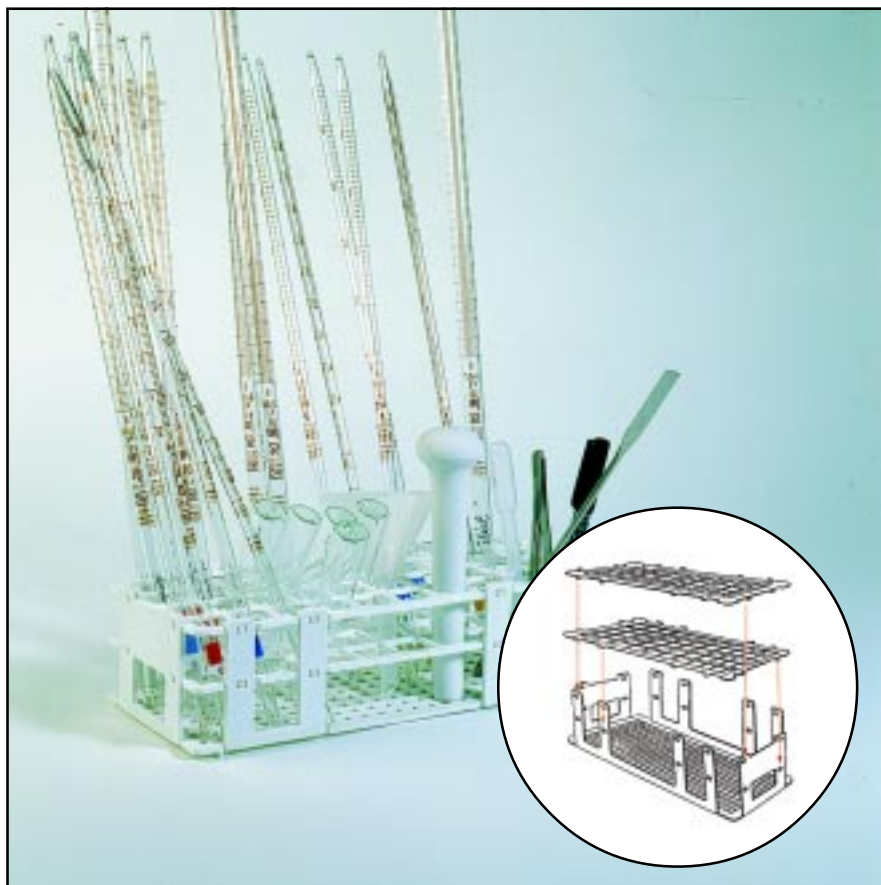


Une deuxième lampe à rayons ultra-violettes fonctionnant à piles pouvant émettre des rayons d'ondes longues de 366 nanomètres de longueur pour une autre détection de taches invisibles. Encore une fois, placez la chromatoplaquette dans une pièce ou endroit sombre (au-dessous de la table, dans un tiroir, une boîte ou un meuble) et exposez-la à la source de rayons ultra-violettes. Toutes les taches sensibles à cette lumière deviennent alors visibles. Marquez-les à l'aide du crayon fourni pour une évaluation ultérieure.



Un deuxième récipient est fourni devant servir de réservoir pour la coloration iodée des taches invisibles n'ayant pas été détectées par les rayons UV. Ajoutez quelques cristaux d'iode au récipient, fermez et chauffez sur une plaque pendant 30 secondes environ. Au lieu de cela, vous pouvez aussi exposer le récipient fermé à la lumière solaire directe pendant cinq minutes environ. L'iode se transforme progressivement en corps gazeux et sature l'atmosphère du récipient de vapeurs iodées de couleur violet foncé. Placez la chromatoplaquette dans le réservoir et des taches tout à fait invisibles apparaissent progressivement, de couleur jaune brun. Le temps de développement est achevé au bout d'une minute environ.

IV. Nettoyage



Nettoyez soigneusement toutes les pipettes droites, tout le matériel de verre et autres accessoires de laboratoire après utilisation. Éliminez toutes les solutions d'échantillon et rincez les flacons vides à l'eau en utilisant suffisamment de produit détergent. Rincez enfin tout le matériel de verre à l'eau déionisée, si celle-ci est disponible, avant de le sécher pour éviter la formation de mous- ses ou de taches. Placez toutes les pi- pettes et les conteneurs de verre dans le casier fourni pour faciliter le séchage.

Les pipettes très sales ou bouchées doi- vent être plongées dans un solvant d'extraction approprié, une solution détergente, de l'acide acétique à 50% ou du peroxyde d'hydrogène à 10% avant le nettoyage final.

Remarque: Utilisez un conteneur pour liquides usagés conforme, en polypro- pylène de préférence, pour le dépôt des réactifs et solutions de test. Pour d'autres dépôts, suivez les réglemen- tations locales de votre région.

V. Remise en place du Minilab dans son état d'origine



Après le nettoyage et le séchage, ins- tallez tout le matériel utilisé dans la valise de protection. Disposez le tout comme indiqué par les photos. Fermez la valise et placez-la dans un endroit sûr. La valise possède un système d'étanchéité à l'air et à l'eau garantissant une protection parfaite contre l'humidité.



Assemblage final du Minilab.

7.7 Cotrimoxazole

Examen Primaire via Inspection Visuelle & Test de Désintégration

I. INSPECTION VISUELLE

Cherchez les anomalies d'étiquetage, d'emballage et de formes de dosage comme il est décrit dans les chapitres concernant les méthodes générales et les procédés. Inscrivez toutes les caractéristiques du produit en utilisant le Formulaire de Rapport en tant que guide. Co-Trimoxazole est une combinaison antibiotique de triméthoprimé et de sulfaméthoxazole en un rapport fixe de 1:5. Chaque comprimé contient normalement 480 mg de cotrimoxazole (80 mg de triméthoprimé + 400 mg de sulfaméthoxazole). Les comprimés contenant seulement 120 mg de cotrimoxazole (20 mg de triméthoprimé + 100 mg de sulfaméthoxazole) sont à usage pédiatrique.

II. TEST DE DÉSINTÉGRATION

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

III. RÉSULTATS ET MESURES À PRENDRE

Les produits pharmaceutiques d'origine particulièrement bon marché, les produits pharmaceutiques dont les documents d'accompagnement sont incorrects ou manquants, avec des formes de dosage ou d'emballages défectueux, ou dont les étiquettes sont incomplètes, endommagées, manquantes ou écrites en langue étrangère devraient être soumis à un examen de chromatographie en couche mince.

Vérification d'Identité et de Contenu du Médicament via la Chromatographie

I. PRINCIPE

Le triméthoprimé et le sulfaméthoxazole sont extraits des comprimés avec du méthanol et déterminé par CCM avec référence à un médicament standard authentique.

II. EQUIPEMENT ET RÉACTIFS

- 1) Pilon
- 2) Feuille d'aluminium
- 3) Flacons de verre de laboratoire d'une capacité de 25 à 100 ml
- 4) Lot de pipettes droites (1 à 25 ml)
- 5) Petits flacons de verre 10 ml
- 6) Bande d'étiquettes
- 7) Crayon marqueur
- 8) Crayon
- 9) Plaquettes d'aluminium CCM Merck pré-enrobées avec gel de silice 60 F 254, taille 5 x 10 cm
- 10) Microcapillaires de verre de 2 µl de capacité
- 11) Plaque chaude
- 12) Chambre de développement CCM
- 13) Papier filtre
- 14) Paire de ciseaux
- 15) Rayons UV de 254 nm
- 16) Chambre iodée
- 17) Paire de pincettes
- 18) Méthanol
- 19) Ethylacétate
- 20) Comprimés de référence de Cotrimoxazole 120 mg

III. PRÉPARATION DE LA SOLUTION STANDARD DE BASE

Pour la préparation de la solution standard de base, il vous faut un comprimé de référence entier contenant 120 mg de cotrimoxazole. Pour l'extraction procédez comme suit: enveloppez le comprimé dans une feuille d'aluminium et réduisez-le en fine poudre en utilisant un pilon. Versez le contenu dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml et faites écouler tous les résidus solides à l'aide de 10.0 ml de méthanol en utilisant une pipette droite. Fermez le flacon et agitez pendant trois minutes environ jusqu'à dissolution de la plus grande partie du solide. Laissez reposer pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que les résidus non dissouts se déposent au-dessous du liquide clair de surface. Cette solution de base devrait contenir 12 mg de médicament total par ml. Étiquetez-la en tant que "Solution Standard de base de Cotrimoxazole" Préparez cette solution juste avant chaque examen.

IV. PRÉPARATION DE LA SOLUTION STANDARD DE TRAVAIL 100% (LIMITE SUPÉRIEURE DE TRAVAIL)

Introduisez à l'aide de la pipette 2 ml de solution standard de base claire dans un petit flacon de 10 ml et ajoutez 2 ml de méthanol. Fermez et agitez le petit flacon. La solution devrait contenir 6 mg de médicament total/ml; étiquetez-la en tant que "Solution Standard de Travail de Cotrimoxazole 100%". La solution standard de travail constitue un produit pharmaceutique de bonne qualité contenant 100% de cotrimoxazole.

V. PRÉPARATION DE LA SOLUTION STANDARD DE TRAVAIL 80% (LIMITE INFÉRIEURE DE TRAVAIL)

Introduisez à l'aide de la pipette 2 ml de la solution standard de base claire dans un petit flacon de 10 ml et ajoutez 3 ml de méthanol. Fermez et agitez le petit flacon. Cette solution devrait contenir 4.8 mg de médicament total/ml et être étiquetée en tant que "Solution Standard de Travail de Cotrimoxazole 80%". La solution standard inférieure de travail constitue un produit de moindre qualité contenant juste 80% de la quantité de cotrimoxazole indiquée sur l'étiquette du produit. Pour les examens courants, ce niveau de remède représente la limite la plus basse acceptable pour un produit donné.

VI. PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'ÉCHANTILLON DE BASE D'UN PRODUIT PHARMACEUTIQUE EXIGEANT UNE VALEUR DE 120 MG DE COTRIMOXAZOLE PAR UNITÉ

Pour la préparation d'une solution d'échantillon de base, il vous faut un comprimé entier d'un produit pharmaceutique approprié prélevé, sur le secteur d'activité. La procédure précise d'extraction est la même que pour un comprimé de référence de co-trimoxazole: enveloppez un comprimé dans une feuille d'aluminium et réduisez-le en fine poudre. Introduisez la poudre quantitativement dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml. Ajoutez 10 ml de méthanol, fermez le flacon et agitez-le pendant trois minutes environ jusqu'à dissolution de la plus grande partie du solide. Laissez reposer la solution pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que le résidu non dissout se dépose au-dessous du liquide clair de surface. Étiquetez le flacon en tant que "Solution d'Echantillon de Base de Cotrimoxazole". La solution devrait contenir 12 mg de médicament total/ml. Préparez la solution juste avant chaque test.

VII. PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'ÉCHANTILLON DE BASE D'UN PRODUIT PHARMACEUTIQUE EXIGEANT UNE VALEUR DE 480 MG DE COTRIMOXAZOLE PAR UNITÉ

A) Pour la préparation d'une solution d'échantillon de base, il vous faut un comprimé entier d'un produit pharmaceutique approprié prélevé sur le secteur. Pour l'extraction procédez précisément de la façon suivante: réduisez le comprimé d'échantillon en fine poudre et transférez quantitativement tous les solides obtenus dans un flacon de laboratoire de verre de 25 ml. Ajoutez 20 ml de méthanol, fermez le flacon et agitez pendant trois minutes jusqu'à ce que la plus grande partie du solide soit dissoute. Laissez reposer la solution pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que les résidus non dissouts se déposent au-dessous du liquide clair de surface.

B) Diluez à nouveau en mélangeant 2 ml du liquide clair avec 2 ml de méthanol dans un petit flacon de verre de 10 ml. Fermez, agitez le flacon et étiquettez-le en tant que "Solution d'Echantillon de Base de Cotrimoxazole". Cette solution devrait contenir 12 mg de médicament total/ml. Préparez cette solution juste avant chaque test.

VIII. PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'ÉCHANTILLON DE TRAVAIL

Introduisez à l'aide la pipette 2 ml de solution claire d'échantillon de base dans un petit flacon de verre de 10 ml et ajoutez 2 ml de méthanol. Fermez, agitez le petit flacon et étiquettez-le en tant que "Solution d'Echantillon de Travail de Cotrimoxazole". La concentration escomptée de triméthoprime dans la solution d'échantillon de travail est de 1,0 mg/ml, la concentration de sulfaméthoxazole de 5.0 mg/ml. Les deux concentrations devraient égaler la concentration de triméthoprime & sulfaméthoxazole de la solution standard de travail supérieure.

IX. APPLICATION DES TACHES

Tracez une ligne d'origine parallèle et à environ 1.5 cm du coin inférieur de la chromatoplaquette et appliquez 2 µl de chaque solution test et standard comme il est montré sur la page ci-contre, en utilisant des pipettes microcapillaires.

On peut placer jusqu'à cinq taches sur une plaquette. Contrôlez l'uniformité de toutes les taches à l'aide de rayons UV de 254 nm. Toutes les taches doivent être rondes de forme et également réparties sur la ligne d'origine. Bien qu'elles puissent différer en intensité, elles ne doivent jamais différer en diamètre. Des intensités différentes sont dues à des quantités résiduelles d'excipients de comprimés ou de gélules ou à des concentrations différentes de médicaments dans les solutions d'échantillons. Une différence dans la taille de la tache, cependant, est due à une mauvaise application. Répétez cette étape si les taches ne possèdent pas une apparence homogène.

X. DÉVELOPPEMENT

Introduisez à l'aide d'une pipette 15 ml d'éthylacétate et 5 ml de méthanol dans le récipient utilisé en tant que chambre de développement CCM. Fermez la chambre et mélangez fermement. Bordez les parois de la chambre avec du papier filtre et attendez environ 15 minutes afin d'assurer la saturation de la chambre par les vapeurs du solvant. Placez avec précaution la plaquette CCM munie des taches dans le récipient. Fermez celui-ci et attendez le développement de la plaquette jusqu'à ce que la ligne avant du solvant ait atteint environ trois-quarts de la longueur de la chromatoplaquette. La phase de développement dure environ 20 minutes. Otez la plaquette de la chambre, marquez la ligne avant du solvant et faites évaporer tous les excédents du solvant en utilisant une plaque chaude au besoin.

XI. DÉTECTION

Séchez tous les résidus des solvants et observez la chromatoplaquette aux rayons UV de 254 nm. Examinez aussi la plaquette après la coloration à l'iode.

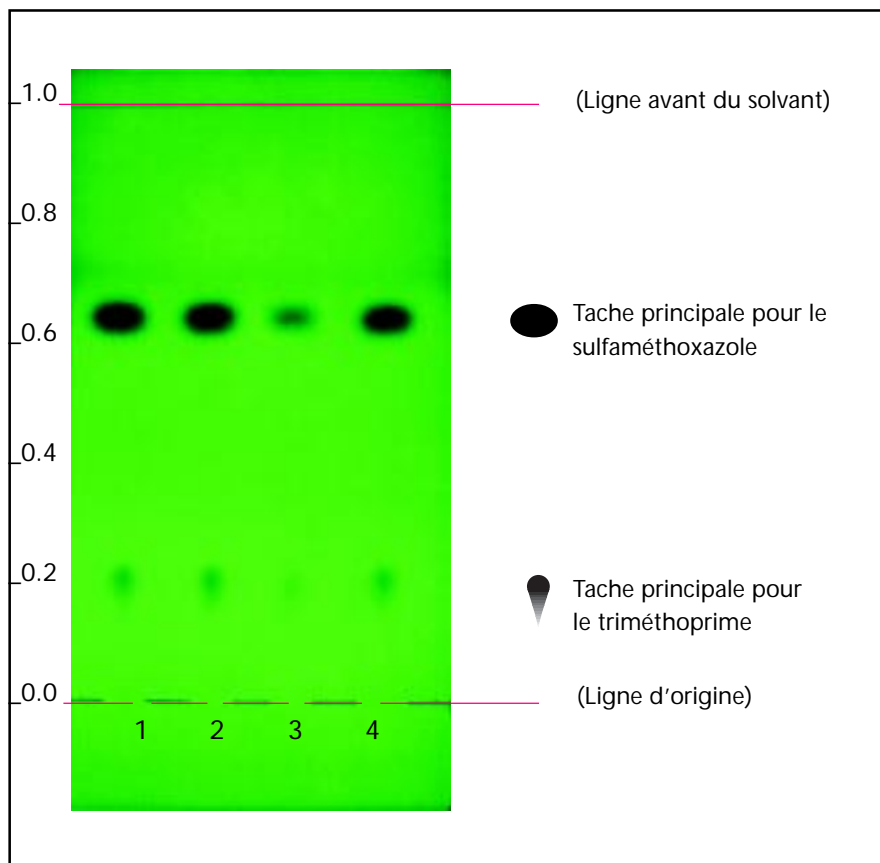
XII. CHROMATOPLAQUETTE OBSERVÉE À 254 NM

Développement n°1 :
Limite supérieure de travail de Cotrimoxazole représentant 100% du médicament complet.

Développement n°2 :
Un médicament de bonne qualité

Développement n°3 :
Un médicament de mauvaise qualité

Développement n°4 :
Limite inférieure de travail de Cotrimoxazole représentant 80% du médicament complet.



XIII. OBSERVATIONS À 254 NM

La présence de cotrimoxazole est signalée par deux taches principales, l'une représentant le sulfaméthoxazole et située à l'avant à une distance de déplacement d'environ 0.65 suivie d'une seconde tache représentant le triméthoprime à une distance d'environ 0.24. Ne libérez pas le lot avant que les deux taches soient visibles simultanément. D'autres taches fortes produites par la solution de test signalent une décomposition de médicament surtout lorsqu'elles sont associées à des taches principales plus petites. Des taches beaucoup plus pâles peuvent apparaître cependant, dans l'espace inférieur du chromatogramme, dues aux agents auxiliaires inclus dans les différentes formules de comprimés et gélules.

XIV. OBSERVATIONS LORS DE LA COLORATION IODÉE

Deux taches brunes apparaissent, égalant les taches déjà observées aux rayons UV de 254 nm. La tache représentant le sulfaméthoxazole attire facilement l'iode et vire instantanément à l'orange-brun alors que la tache représentant le triméthoprime ne réagit que modérément à la coloration iodée. Il peut se passer un certain temps avant que les taches de triméthoprime n'apparaissent, en particulier si la chambre iodée n'est pas correctement activée.

XV. RÉSULTATS ET MESURES À PRENDRE

La tache principale obtenue dans le chromatogramme avec la solution de test doit correspondre aux données de couleur, de taille, de distance de déplacement du chromatogramme obtenu avec la solution standard supérieure et inférieure. Ce résultat doit être obtenu pour chaque méthode de détection. Si ce n'est pas réalisé, répétez le développement avec un deuxième échantillon. Rejetez le lot s'il est impossible de constater le contenu du médicament après un troisième développement. Transmettez des échantillons supplémentaires à un laboratoire de contrôle de médicaments entièrement équipé afin d'obtenir un deuxième avis. Gardez des échantillons et placez le lot en quarantaine jusqu'à la prise d'une décision définitive de rejet ou de libération des médicaments.