

# Manual

Accompagnant le GPHF-Minilab®

Supplément 2013

Volume II

## TESTS DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE



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



**USAID**  
FROM THE AMERICAN PEOPLE



PROMOTING THE QUALITY OF MEDICINES

## **SUPPLÉMENT 2013 AU VOLUME II DES TESTS DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE**

**Rédigé par**

Richard W. O. Jähnke, Kornelia Dwornik, Kai Fischer et Souly Phanouvong

\* \* \*

**Revu par**

Adrian Barojas, Daniel Bempong, Sanford Bradby, Kennedy Chibwe, Yanga Dijiba, Latifa El Hadri, Mustapha Hajjou, Lukas Roth et Patrick Lukulay

\* \* \*

**Publié par**

Le Global Pharma Health Fund (GPHF), une organisation caritative créée et soutenue par Merck Darmstadt · Allemagne, et le programme Promoting the Quality of Medicines (PQM) de la United States Pharmacopeia (USP)

\* \* \*

**Copyright © GPHF & USP PQM**

\* \* \*

**Remerciements**

La publication de ce supplément a été rendue possible grâce au généreux soutien financier des Etats-Unis par l'intermédiaire de la United States Agency for International Development (USAID). Le GPHF et le USP PQM sont responsables du contenu de ce manuel et celui-ci ne reflète pas nécessairement les opinions de l'USAID ou du Gouvernement des Etats-Unis.

\* \* \*

**Le projet GPHF-Minilab®**

La prolifération des médicaments contrefaits constitue un danger sérieux pour la santé. L'organisation internationale de police criminelle (Interpol) estime qu'une proportion inquiétante de dix à trente pour cent de tous les médicaments distribués dans les pays en voie de développement est soit contrefaite, ou présente à la base une qualité insuffisante. Le combat des contrefaçons a pour but d'assurer que les investissements réalisés dans les programmes de santé pendant plusieurs décennies ne sont pas anéantis par manque de vigilance.

Afin de lutter contre les médicaments anti-infectieux contrefaits ou de qualité très médiocre infiltrant les organisations d'approvisionnement en médicaments et les programmes prioritaires de traitement des maladies dans les pays à paludisme, tuberculose et VIH/SIDA endémiques, le Global Pharma Health Fund (GPHF) à Francfort, une organisation caritative exclusivement soutenue par Merck, Darmstadt · Allemagne, a développé et organisé la distribution à coût modéré du GPHF-Minilab®, un mini-laboratoire destiné à une vérification rapide de la qualité des médicaments et à la détection de produits pharmaceutiques contrefaits.

Depuis de nombreuses années, les GPHF-Minilabs agissent en tant que défense de première ligne dans le combat contre les médicaments contrefaits et de qualité substandard menaçant la santé de millions d'individus vivant dans les pays en voie de développement. Dans le monde entier, plus de 570 Minilabs ont déjà été fournis dans 80 pays à travers les régions d'Afrique, d'Asie-Pacifique et d'Amérique latine.

Les institutions gouvernementales de la santé publique et les agences nationales de la sécurité des médicaments en coopération avec l'Organisation Mondiale de la Santé et le programme Promoting the Quality of Medicines (PQM) de la U.S. Pharmacopeia (USP) représentent les principaux partenaires actifs. Ces dernières années, des projets communs de contrôle de qualité des médicaments, mis en place en Asie du sud-est et en Afrique orientale ont permis la saisie par Interpol de millions de comprimés antipaludiques contrefaits ne contenant aucun principe actif.

Un besoin toujours constant de contrôle de qualité des médicaments, simple et de coût abordable dans les pays à bas revenus, constitue aujourd'hui l'un des moteurs principaux dans la mise au point de nouveaux protocoles de tests pour le GPHF-Minilab®. Le besoin de généralisation de tests souligne l'importance de la collaboration avec nos partenaires actifs aux Etats-Unis. Pour une plus grande sécurité des patients et une meilleure situation sanitaire dans les pays en voie de développement, d'autres partenaires sont invités à se joindre à nous.

\* \* \*

Réalisé par Grimm Graphic Design, Ochsenfurt, Allemagne

# Table des Matières

Chapitre	Page
Nouvelles procédures individuelles de tests chromatographiques .....	4
<i>Supplément au Volume II, Chapitre 6</i>	
<i>Médicaments antipaludéens, antituberculeux et antibactériens</i>	
6.65 Amoxicilline trihydrate (en formules combinées de clavulanate de potassium) .....	4
6.66 Artéméter (en comprimés classiques ou dispersibles et sirops secs de luméfántrine) .....	8
6.67 Ciprofloxacine (en tant que chlorhydrate et base libre incl. les formules à libération prolongée) .....	12
6.68 Clarithromycine (en comprimés et gélules à formule unique) .....	16
6.69 Clavulanate de potassium (en formules combinées d'amoxicilline) .....	20
6.70 Kanamycine (en tant que monosulfate dans les poudres pour injection) .....	24
6.71 Luméfántrine (en comprimés classiques ou dispersibles et sirops secs d'artéméter) .....	28
6.72 Ofloxacine (en comprimés et gélules à formule unique) .....	32
Tableau synoptique des procédures de test chromatographiques .....	36
<i>Supplément au Volume II, Chapitre 7</i>	
Liste actualisée des substances témoin du GPHF-Minilab® .....	37
<i>Supplément au Volume II, Chapitre 10</i>	
Santé & Sécurité .....	39

## 6.65 Amoxicilline trihydrate (en formules combinées de clavulanate de potassium)

### Examen Primaire du Médicament via Inspection Physique & Test de Désintégration

#### I. INSPECTION PHYSIQUE

Chercher les anomalies d'étiquetage, d'emballage et de forme galénique, comme il est décrit dans les chapitres d'entrée concernant les méthodes et les procédés généraux du manuel principal. Inscrire toutes les caractéristiques de produit en utilisant le formulaire de rapport en tant que guide. Tout comprimé ou toute gélule contient normalement de l'amoxicilline trihydrate exprimée en un dosage final de 250, 500, 750, 875 et 1000 mg d'amoxicilline anhydre. Les comprimés d'amoxicilline 500 et 875 mg sont fréquemment combinés à 125 mg d'acide clavulanique sous la forme de son sel de potassium. D'autres dosages d'amoxicilline et d'acide clavulanique en formule unique et combinaisons à dose fixe sont connus.

#### II. TEST DE DESINTEGRATION

Combinés ou non au clavulanate de potassium, tous les comprimés et gélules d'amoxicilline à libération rapide doivent réussir le test de désintégration tel qu'il est décrit dans les chapitres d'entrée concernant les méthodes et les procédés généraux du manuel principal. 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 & MESURES A PRENDRE

Les produits pharmaceutiques particulièrement bon marché, les produits pharmaceutiques dont les documents d'accompagnement manquent ou sont incorrects, à formule médicamenteuse erronée ou à emballage défectueux, à étiquettes incomplètes, endommagées, manquantes ou rédigées en langue étrangère, doivent être soumis à un essai de chromatographie sur couche mince.

### Vérification de l'Identité et de la Teneur en Substance Active via le Test de CCM

#### I. PRINCIPE

Combinée ou non au clavulanate de potassium, l'amoxicilline est extraite des comprimés et gélules à l'aide de solution d'ammoniaque diluée et déterminée par chromatographie sur couche mince (CCM) en référence à une substance témoin. Pour une vérification rapide de la qualité concernant la fraction de clavulanate de potassium, veuillez consulter le protocole correspondant présenté dans ce supplément.

#### II. EQUIPEMENT ET REACTIFS

- |  |   |
|--|---|
| 1) Pilon   | 13) Plaque chauffante   |
| 2) Feuille d'aluminium   | 14) Papier filtre   |
| 3) Entonnoir   | 15) Paire de ciseaux  |
| 4) Bande adhésive  | 16) Paire de pincettes  |
| 5) Stylo feutre  | 17) Lampe UV de 254 nm  |
| 6) Crayon et règle graduée   | 18) Cuve d'immersion (bêcher de 250 ml)   |
| 7) Fioles de verre de 10 ml  | 19) Cuve de révélation à l'iode   |
| 8) Kit de pipettes graduées (1 à 25 ml)  | 20) Ammonium hydroxyde concentrée   |
| 9) Kit de flacons de verre de laboratoire (25 à 100 ml)  | 21) Acétate d'éthyle  |
| 10) Plaques d'aluminium CCM Merck pré-enduites au gel de silice 60 F <sub>254</sub> , taille 5x10 cm | 22) Acide acétique anhydre  |
| 11) Tubes capillaires de verre (2-µl de capacité)  | 23) Méthanol  |
| 12) Cuve chromatographique (récipient de 500-ml)   | 24) Ninhydrine  |
|  | 25) Eau   |
|  | 26) Substance témoin, des comprimés contenant 500 mg d'amoxicilline, par exemple, avec ou sans clavulanate de potassium |

<p>III. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN DU STOCK</p>	<p>Pour la préparation de la solution témoin du stock, il faut un étalon de référence, des comprimés contenant 500 mg d'amoxicilline, par exemple, avec ou sans clavulanate de potassium. Envelopper un comprimé de référence dans une feuille d'aluminium et le réduire en fine poudre en utilisant un pilon. Verser avec précaution le contenu de la feuille d'aluminium au-dessus d'un flacon de verre de laboratoire de 100 ml et faire écouler tous les résidus solides à l'aide de 45 ml d'eau, puis de 5 ml de solution d'ammoniaque concentrée en utilisant des pipettes graduées. Fermer le flacon et agiter pendant trois minutes environ jusqu'à dissolution de la plus grande partie des solides. Laisser reposer la solution pendant cinq minutes encore jusqu'à ce que les résidus non dissous se déposent au fond du flacon. Combinée ou non à l'acide clavulanique, la solution obtenue doit contenir 10 mg d'amoxicilline totale par ml et être étiquetée en tant que 'Solution Témoin du Stock d'Amoxicilline'. Ne préparer cette solution que juste avant la réalisation du test. Continuer à travailler avec le liquide clair ou trouble.</p>
<p>IV. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN D'USAGE 100% (LIMITE SUPERIEURE)</p>	<p>A l'aide des pipettes graduées, introduire 1 ml de la solution témoin du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 3 ml de méthanol. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 2,5 mg d'amoxicilline par ml et être étiquetée en tant que 'Solution Témoin d'Usage d'Amoxicilline 100%'.  Cette solution témoin d'usage supérieure constitue un médicament de bonne qualité contenant 100 % d'amoxicilline.</p>
<p>V. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN D'USAGE 80% (LIMITE INFERIEURE)</p>	<p>A l'aide des pipettes graduées, introduire 1 ml de la solution témoin du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 4 ml de méthanol. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 2,0 mg d'amoxicilline totale par ml et être étiquetée en tant que 'Solution Témoin d'Usage d'Amoxicilline 80%'.  Cette solution témoin d'usage inférieure constitue un produit de moindre qualité contenant seulement 80% d'amoxicilline tel que l'indique l'étiquette du médicament. Dans la recherche présente, cette teneur en substance active représente la limite la plus basse acceptable pour tout produit pharmaceutique approprié.</p>
<p>VI. PREPARATION D'UNE SOLUTION ESSAI DU STOCK A PARTIR D'UN COMPRIME OU D'UNE GELULE DECLARANT UNE TENEUR EN AMOXICILLINE DE 250 MG A L'UNITE</p>	<p>Prendre un comprimé ou une gélule entiers d'un produit pharmaceutique approprié, acquis en magasin ou sur le marché. Comme à l'habitude, envelopper les comprimés dans une feuille d'aluminium et les broyer finement. Introduire toute la poudre obtenue dans un flacon de verre de laboratoire de taille correspondante. La poudre obtenue à partir d'une gélule doit être introduite directement dans le flacon, ainsi que les deux parties de l'enveloppe de gélule. Pour l'extraction, ajouter 22,5 ml d'eau puis 2,5 ml de solution d'ammoniaque concentrée utilisant des pipettes graduées adaptées. Fermer ensuite 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.</p>
<p>500 MG D'AMOXICILLINE A L'UNITE</p>	<p>Prendre un comprimé ou une gélule complets et procéder à l'extraction de la substance active à partir de la poudre obtenue à l'aide de 45 ml d'eau et 5 ml d'ammonium hydroxyde concentrée. Continuer à travailler comme ci-dessus.</p>
<p>750 MG D'AMOXICILLINE A L'UNITE</p>	<p>Prendre un comprimé ou une gélule complets et procéder à l'extraction de la substance active à partir de la poudre obtenue à l'aide de 67,5 ml d'eau et 7,5 ml d'ammonium hydroxyde concentrée. Continuer à travailler comme ci-dessus.</p>
<p>875 MG D'AMOXICILLINE A L'UNITE</p>	<p>Prendre un comprimé ou une gélule complets et procéder à l'extraction de la substance active à partir de la poudre obtenue à l'aide de 79 ml d'eau et 8,5 ml d'ammonium hydroxyde concentrée. Continuer à travailler comme ci-dessus.</p>
<p>1000 MG D'AMOXICILLINE A L'UNITE</p>	<p>Prendre un comprimé ou une gélule complets et procéder à l'extraction de la substance active à partir de la poudre obtenue à l'aide de 90 ml d'eau et 10 ml d'ammonium hydroxyde concentrée. Continuer à travailler comme ci-dessus.  Combinées ou non au clavulanate de potassium, toutes les solutions essai du stock produites doivent contenir finalement 10 mg d'amoxicilline par ml et être étiquetées en tant que 'Solution Essai du Stock d'Amoxicilline'. Ne préparer ces solutions que juste avant la réalisation du test. Continuer à travailler avec les liquides clairs ou troubles.</p>

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

A l'aide des pipettes graduées, introduire 1 ml de la solution d'essai du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 3 ml de méthanol. Fermer, agiter la fiole et l'étiqueter en tant que '*Solution Essai d'Usage d'Amoxicilline*'.

La concentration escomptée d'amoxicilline de cette solution essai d'usage est de 2,5 mg par ml et doit égaler la concentration d'amoxicilline de la solution témoin d'usage supérieure produite ci-dessus.

## VIII. DEPOT D'ECHANTILLON

Tracer une ligne de base parallèle à environ 1,5 cm de l'extrémité inférieure de la plaque CCM et déposer 2 µl de chaque solution essai et témoin comme le présente 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. Tous les dépôts 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.

Noter que le remplissage des pipettes microcapillaires peut demander un certain temps quand il s'agit de solutions d'échantillons aqueuses. Les résidus aqueux provoquant des taches floues ou un étirement de celles-ci, sécher complètement tous les solvants d'extraction avant le développement du chromatogramme en utilisant la plaque chauffante fournie.

## IX. DEVELOPPEMENT DU CHROMATOGRAMME

A l'aide des pipettes graduées, introduire 15 ml d'acétate d'éthyle, 5 ml d'acide acétique anhydre et 5 ml d'eau dans le récipient utilisé en tant que cuve chromatographique. Fermer la cuve et mélanger fermement. Border les parois de la cuve avec du papier filtre et attendre environ 15 minutes afin d'assurer la saturation de la cuve par les vapeurs de solvant. Déposer avec précaution la plaque CCM chargée dans la cuve. Fermer la cuve et réaliser le développement de la chromatoplaque jusqu'à ce que la ligne de front du solvant se soit déplacée sur une longueur de trois-quarts de la plaque; la durée du développement est de 30 minutes environ. Retirer la plaque de la cuve, marquer la ligne de front du solvant et faire évaporer tout résidu de solvant à l'aide d'une plaque chauffante, si nécessaire.

## X. REVELATION DES TACHES

Sécher tous les résidus de solvant et observer la chromatoplaque à la lumière UV de 254 nm avant et après la coloration à l'iode. Utiliser cette méthode de révélation à des fins d'identification et de quantification de l'amoxicilline.

Il est possible de procéder à une vérification supplémentaire de l'identité et du contenu d'amoxicilline en observant une deuxième plaque à la lumière du jour après une coloration ninhydrine. Ceci indiquerait aussi la présence de clavulanate de potassium. A cet effet, dissoudre 3 g de ninhydrine (10 fois env. une spatule bien remplie) dans un mélange de 150 ml de méthanol et 30 ml d'acide acétique anhydre. Utiliser le bécher en plastique fourni pour préparer la solution de coloration. Tremper alors la chromatoplaque dans la solution en utilisant une paire de pincettes. Retirer immédiatement la plaquette du bécher, laisser couler tout le surplus de solution sur du papier tissu et essuyer ensuite le dos de la plaque en utilisant à nouveau le papier tissu. Continuer à sécher toute la solution de coloration sur une plaque chaude et observer l'apparition progressive des taches d'amoxicilline, et en cas de combinaison à dose fixe, celles de clavulanate de potassium.

Le processus de coloration ninhydrine est entièrement représenté à la page 26 du manuel principal de l'édition 2008. Veuillez noter que la coloration à la ninhydrine rendra impossible une nouvelle observation des taches visibles auparavant à la lumière UV de 254 nm. Noter aussi que la peau entrée en contact avec la solution de ninhydrine sera également colorée. Cela ne présente toutefois aucun danger pour la santé; les taches violettes disparaîtront au bout d'un jour ou deux.

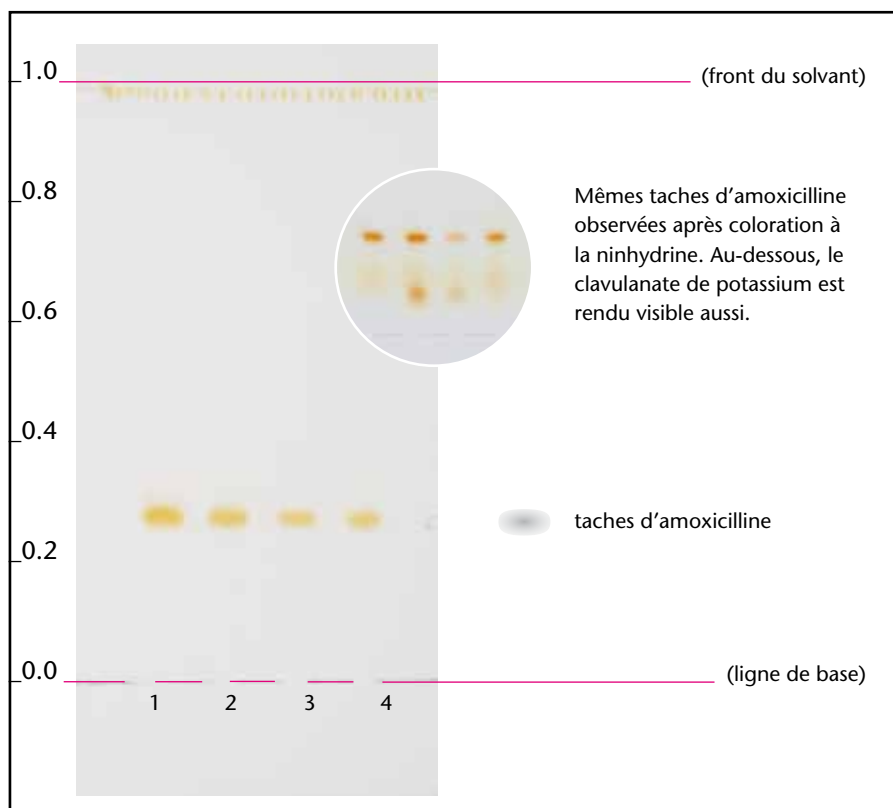
## XI. CHROMATOPLAQUE OBSERVEE A LA LUMIERE DU JOUR APRES COLORATION A L'IODE

Développement n°1:  
Solution témoin supérieure représentant 100% d'amoxicilline totale

Développement n°2:  
Un médicament de bonne qualité à teneur acceptable en amoxicilline

Développement n°3:  
Un médicament de basse qualité à teneur inacceptable en amoxicilline

Développement n°4:  
Solution témoin inférieure représentant 80% d'amoxicilline totale



## XII. OBSERVATIONS A LA LUMIERE UV DE 254 NM

Le clavulanate de potassium resterait invisible ici et une faible tache bleutée à une distance de déplacement de 0,27 env. indique la présence d'amoxicilline dans la solution de test.

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

Toutes les taches d'amoxicilline déjà observées à 254 nm tournent maintenant en un ton brun jaune et le tache de clavulanate de potassium resterait à nouveau invisible. Continuer à observer la plaque quand l'iode commence déjà à s'évaporer. Les taches reflétant une qualité moindre de produit disparaîtront d'abord, progressivement suivies des taches de référence représentant une teneur en substance active de 80 à 100 pour cent, respectivement.

## XIV. OBSERVATIONS A LA LUMIERE UV DE 254 NM APRES COLORATION A L'IODE

Toutes les taches d'amoxicilline déjà observées avant la coloration à l'iode s'accroissent maintenant et le clavulanate de potassium resterait à nouveau invisible ici aussi. Des taches foncées supplémentaires générées par la solution essai indiqueront la présence d'autres agents actifs ou une détérioration d'amoxicilline; ce dernier cas est plus probable si les taches sont accompagnées d'une tache principale plus petite. Les agents auxiliaires intégrés aux différentes formules de comprimés et gélules peuvent créer la formation de quelques taches pâles apparaissant près la ligne de base ou sur celle-ci.

## XV. OBSERVATIONS A LA LUMIERE DU JOUR APRES COLORATION A LA NINHYDRINE

Toutes les taches d'amoxicilline précédemment observées avant et après la coloration à l'iode tournent maintenant en un ton orange foncé passant progressivement au rouge. Les taches apparaissant à une distance de déplacement de 0,15 env. indiqueraient maintenant aussi la présence de clavulanate de potassium. Pour une vérification supplémentaire de l'identité et de la teneur en clavulanate de potassium dans les formules combinées d'amoxicilline, veuillez vous référer au protocole 6,69 de la page 20 de ce manuel supplément.

## XVI. RESULTATS & MESURES A PRENDRE

La tache d'amoxicilline dans le chromatogramme obtenue avec la solution essai doit correspondre en termes de couleur, de taille, d'intensité, de forme et de distance parcourue à la tache du chromatogramme obtenue avec la solution témoin supérieure et inférieure. On doit parvenir à ce résultat pour chaque méthode de révélation. Si ce n'est le cas, répéter le développement depuis le début avec un deuxième échantillon. Rejeter 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 jugement. 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. A des fins de documentation, prendre des photos des différentes lectures avec un appareil-photo numérique; éteindre d'abord le flash.

# Véritable ou contrefait?



Lutter contre les médicaments contrefaisants · Protéger la vie



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

**Global Pharma Health Fund**  
Frankfurt, Allemagne  
Tél. +49-69-46939-662  
Fax +49-69-46939-852  
info@gphf.org · www.gphf.org



**USAID**  
FROM THE AMERICAN PEOPLE



## PROMOTING THE QUALITY OF MEDICINES

**U.S. Agency for  
International Development**  
Office of Health, Infectious Diseases  
and Nutrition, Ronald Reagan Bldg.,  
1300 Pennsylvania Avenue NW  
Washington, DC 20523-3700, USA  
Tél. +1-202-712-4789  
Fax +1-202-216-3702  
aboni@usaid.gov · www.usaid.gov

**United States Pharmacopeia**  
Promoting the Quality  
of Medicines program  
12601 Twinbrook Parkway  
Rockville, MD 20852-1790, USA  
Tél. +1-301-816-8162  
Fax +1-301-816-8374  
pqm@usp.org · www.pqmusp.org