

# Manuel

Accompagnant le GPHF-Minilab™

Supplément 2024 avec plus de médicaments pour le traitement des troubles diabétiques et al.

## Tests physiques & Chromatographie sur couche mince



Richard W. O. Jähnke et Kornelia Dwornik



Une association caritative avec le soutien bénévole de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne



The Promoting the Quality of Medicines (PQM) program, funded by the U.S. Agency for International Development (USAID), is implemented by the U. S. Pharmacopeial Convention (USP).

# Table des matières

Chapitre	Page
Santé et sécurité.....	3
Nouveaux protocoles d'essai du Minilab .....	4
7.114 Carbamazépine.....	4
7.115 Empaglifozine combiné ou non à la linagliptine .....	8
7.116 Gliclazide combiné ou non à la metformine.....	12
7.117 Glimépiride.....	16
7.118 Sitagliptine chlorhydrate/phosphate/tartrate/malate y compris leurs hydrates, avec ou sans metformine.....	20
7.119 Vildagliptine combinée ou non à la metformine, y compris linagliptine et sitagliptine apparentées.....	24

### Remarque importante

Les produits chimiques accompagnant le GPHF-Minilab™ ainsi que les produits pharmaceutiques à tester peuvent contenir des substances dangereuses. Par conséquent, les utilisateurs du Minilab ainsi que les assistants doivent suivre exactement toutes les instructions de ce manuel et du manuel principal afin d'éviter des risques possibles pour la santé, résultant d'un contact accidentel avec ces substances ou avec les produits pharmaceutiques.

Il convient de manipuler avec précaution les produits chimiques et pharmaceutiques afin d'éviter la production excessive de poussière ou de vapeurs dans l'atmosphère. L'analyse devrait être effectuée sous une hotte d'aspiration ou en cas de conditions précaires là où une ventilation simple mais suffisante est garantie.

Des symptômes tels que somnolence, difficultés respiratoires, nausées ou éruption cutanée doivent être communiqués au responsable, surtout si de grandes quantités

de dissolvants organiques ont été renversées accidentellement.

En cas de renversement ou d'éclaboussures de liquides affectant la peau ou les yeux, rincez abondamment à l'eau, communiquez l'incident au responsable et, si nécessaire, au médecin local pour de plus amples soins.

Utilisez des vêtements de protection et des lunettes de sécurité lors de la manipulation de solutions de test, par exemple, acides concentrés ou solutions alcalines.



*Utiliser des vêtements de protection, un tablier et des lunettes de sécurité par exemple, avant de commencer tout travail sur le contrôle de qualité des médicaments. Laver soigneusement les mains et le visage après le travail.*

# 7.114 Carbamazépine

## Examen primaire du médicament via inspection physique

### I. INSPECTION PHYSIQUE

Lors de l'inspection visuelle, rechercher les anomalies d'étiquetage, d'emballage et de forme galénique comme décrit dans les premiers chapitres sur des méthodes et opérations générales du manuel principal, puis signaler les résultats. Prendre des photos, par exemple, avec un appareil photo de smartphone si possible. Chaque comprimé soluble, à libération prolongée ou à croquer contient généralement 200, 300, 400 ou 600 mg de carbamazépine. D'autres dosages sont connus pour exister.

Vérifier le poids total des comprimés ou le poids de remplissage des gélules à l'aide de la balance de poche électronique fournie. Toutes les formulations de comprimés ou de gélules de carbamazépine à libération immédiate doivent également réussir le test de désintégration décrit au début du manuel principal. Ils doivent se désintégrer dans l'eau à 37 °C en moins de 30 minutes. Un échec d'un produit à libération immédiate représenterait une anomalie majeure.

### II. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

Les médicaments d'origine particulièrement bon marché, les produits pharmaceutiques dont les documents d'accompagnement sont incorrects ou manquants, dont la forme pharmaceutique ou l'emballage sont défectueux ou dont les étiquettes sont incomplètes, endommagées, manquantes ou rédigées dans une langue étrangère, ou encore les médicaments stockés dans de mauvaises conditions, doivent être soumis à un test de chromatographie sur couche mince.

## Vérification de l'identité et de la teneur en principe actif via le test de CCM

### I. PRINCIPE DU TEST

La carbamazépine est extraite des comprimés ou des gélules avec un volume connu de méthanol et son identité et son contenu sont ensuite vérifiés par chromatographie sur couche mince (CCM) par rapport à un agent de référence approprié.

### II. EQUIPEMENT ET REACTIFS

- 1) Pilon
- 2) Feuille d'aluminium
- 3) Entonnoir
- 4) Spatule
- 5) Bande adhésive
- 6) Stylo feutre
- 7) Crayon et règle gradué
- 8) Fioles de verre de 10 ml
- 9) Kit de pipettes graduées (1 to 25 ml)
- 10) Kit de flacons de verre de laboratoire (25 to 100 ml)
- 11) Plaques d'aluminium CCM Merck pré-enduites au gel de silice 60 F<sub>254</sub> taille 5 x 10 cm
- 12) Tubes capillaire de verre de 2 µl de capacité
- 13) Cuve chromatographique (récipient de 500 ml)
- 14) Plaque chauffante
- 15) Papier filtre
- 16) Pair de ciseaux
- 17) Pair de pincettes
- 18) Lampe UV de 254 nm
- 19) Lampe UV de 366 nm
- 20) Toluène
- 21) Méthanol
- 22) Acétate d'éthyle
- 23) Solution d'acide sulfurique 96%
- 24) Substance témoin, par exemple, des comprimés de carbamazépine à 200 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 200 mg de carbamazépine. 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 25 ml et faire écouler tous les résidus solides à l'aide de 10 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée. Fermer le flacon de laboratoire et agiter pendant environ trois minutes jusqu'à ce que la plupart des solides soient dissous. Laisser reposer la solution pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que les résidus non dissous se déposent au fond du flacon. La solution obtenue doit contenir 20 mg de carbamazépine totale par ml et être étiquetée comme '*Solution Témoin du Stock de Carbamazépine*'. Ne préparer cette solution que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec le liquide surnageant clair ou même trouble.

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

A l'aide des pipettes graduées, introduire 0,5 ml de la solution du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 9,5 ml de méthanol. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 1 mg de substance active totale par ml et être étiquetée comme '*Solution Témoin du Travail de Carbamazépine 100%*'.

Cette solution témoin constitue un médicament de bonne qualité contenant 100% de carbamazépine.

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

A l'aide des pipettes graduées, introduire 0,5 ml de la solution témoin du stock dans une fiole de 25 ml et ajouter 12 ml de méthanol. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 0,8 mg de carbamazépine totale par ml et être étiquetée comme '*Solution Témoin du Travail de Carbamazépine 80%*'.

Cette solution témoin représente un médicament de basse qualité contenant seulement 80% de la quantité de carbamazépine indiquée sur l'étiquette du produit. Dans la recherche présente, ce niveau de teneur en substance active constitue la limite la plus basse acceptable pour un produit pharmaceutique donné. Les limites des pharmacopées ne s'appliquent pas dans notre contexte.

### VI. PREPARATION DE LA SOLUTION ESSAI DU STOCK D'UN MEDICAMENT DECLARANT UNE TENEUR EN CARBAMAZEPINE DE 200 MG PAR UNITE

Prendre un comprimé ou une gélule entière d'un médicament approprié prélevé en magasin ou sur le marché. Comme d'habitude, les comprimés sont enveloppés dans une feuille d'aluminium et réduits en fine poudre à l'aide d'un pilon. Introduire toute la poudre obtenue dans un flacon de laboratoire de 25 ml. La poudre obtenue à partir des gélules doit être placée directement dans un flacon ajoutant aussi les deux parties vides d'enveloppe de gélule à la fin. Pour l'extraction, ajouter 10 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée appropriée. Fermer 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.

#### 300 MG DE CARBAMAZEPINE PAR UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml, ajouter 15 ml de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire la carbamazépine. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

#### 400 MG DE CARBAMAZEPINE PAR UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml, ajouter 20 ml de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire la carbamazépine. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

#### 600 MG DE CARBAMAZEPINE PAR UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 50 ml, ajouter 30 ml de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire la carbamazépine. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

Toutes les solutions essai du stock obtenues doivent finalement contenir 20 mg de carbamazépine totale par ml et être étiquetées comme '*Solution Essai du Stock de Carbamazépine*'. Ne préparer ces solutions que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec les liquides surnageants clairs ou troubles.

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

A l'aide des pipettes graduées, introduire 0,5 ml de la solution essai du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 9,5 ml de méthanol. Fermer la fiole, agiter et étiqueter comme '*Solution Essai d'Usage de Carbamazépine*'.

La concentration attendue de carbamazépine dans cette solution essai de travail est de 1 mg par ml et doit correspondre à la concentration de carbamazépine de la solution témoin du travail 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 ou aux différentes concentrations de médicaments dans les solutions essai. 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.

Sécher délicatement les dépôts. Pour ce faire, tenir la plaque chromatographique avec la paire de pincettes dans le flux d'air chaud directement au-dessus de la plaque chauffante pendant environ 15 secondes. Secouer constamment la plaque CCM et chaque fois que la chromatoplaquette se déplace vers le bas, sa face inférieure peut toucher la surface de la plaque chauffante pendant quelques fractions de seconde.

## IX. DEVELOPPEMENT DU CHROMATOGRAMME

À l'aide des pipettes graduées appropriées, ajouter 10 ml d'acétate d'éthyle, 8 ml de toluène et 2 ml de méthanol 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 la saturation 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. Laisser le front du solvant se déplacer sur une longueur correspondant aux trois-quarts de la plaque environ; la durée du développement est de 12 minutes environ. Retirer la plaque de la cuve, marquer le niveau atteint par le front du solvant au moyen d'un trait fin, puis faire sécher doucement tous les résidus de solvant. Pour ce faire, tenir la plaque chromatographique avec la paire de pincettes dans le flux d'air chaud directement au-dessus de la plaque chauffante pendant environ deux minutes. Secouer constamment la plaque CCM et chaque fois que la chromatoplaquette se déplace vers le bas, sa face inférieure peut toucher la surface de la plaque chauffante pendant quelques fractions de seconde.

## X. REVELATION DES TACHES

Après avoir séché tous les résidus de solvant, observer la plaque de chromatographie sous une lumière UV à 254 nm avec la lampe alimentée par batterie fournie. Pour une meilleure identification de la carbamazépine, colorer la chromatoplate fraîche avec de l'acide sulfurique et chauffage. Pour ce faire, remplir le béccher en plastique de 250 ml fourni avec 190 ml de méthanol, suivis de 10 ml de solution d'acide sulfurique à 96 %, et mélanger soigneusement. Laisser refroidir le mélange et immerger la plaque de chromatographie dans la solution de coloration, en commençant par la face inférieure. Retirer immédiatement la plaque de la solution et laisser l'excès de liquide s'écouler sur une serviette en papier. Essuyer le liquide restant au dos de la plaque et sécher l'ensemble de la solution de coloration pendant environ 30 à 60 secondes à la température maximale sur la plaque chauffante fournie. Après avoir retiré la plaque chromatographique de la plaque chauffante, observer la plaque colorée sous lumière UV à 254 et 366 nm dans l'obscurité.



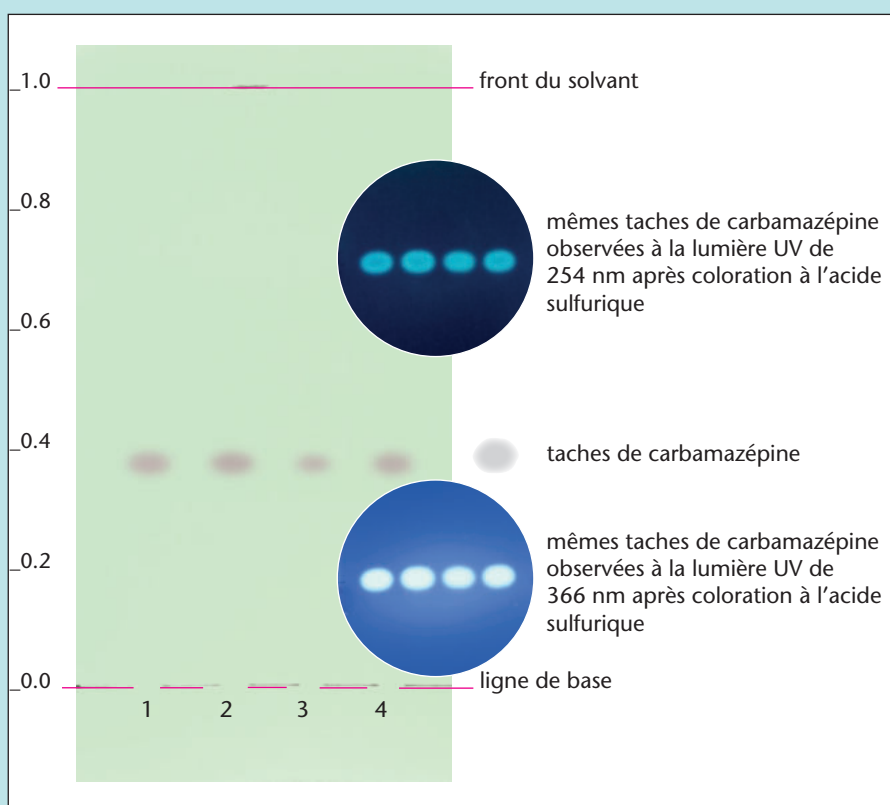
## CHROMATOGRAMME OBSERVE A LA LUMIERE UV DE 254 NM

Développement. n° 1:  
Solution témoin supérieure représentant  
100% de carbamazépine totale

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

Développement. n° 3:  
Un médicament de basse qualité à teneur  
faible inacceptable en carbamazépine

Développement. n° 4:  
Solution témoin inférieure représentant  
80% de carbamazépine totale



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

Une tache sombre à une distance de déplacement d'environ 0,37 indique la présence de carbamazépine dans la solution essai. Les taches fortes supplémentaires générées par la solution essai indiqueraient d'autres médicaments ou une dégradation de la carbamazépine, ce dernier cas étant plus probable lorsqu'il est associé à une tache principale plus petite. Une tache principale plus petite de la solution essai peut également indiquer une faible teneur en carbamazépine et s'il n'y a aucune tache, cela signifierait une absence totale de carbamazépine. Les agents auxiliaires incorporés dans différents produits finis peuvent provoquer des taches plus pâles ou quasi inexistantes se déplaçant le long du front des solvants ou émergeant près ou sur la ligne de base.

### XII. OBSERVATIONS A LA LUMIERE UV DE 256 ET 366 NM APRES COLORATION A L'ACIDE SULFURIQUE

Lorsque la plaque chromatographique est colorée avec de l'acide sulfurique dans la chaleur, aucune tache de carbamazépine n'est visible à la lumière du jour. Cependant, si la plaque colorée est irradiée par une lumière UV de 254 et 366 nm dans une pièce sombre, toutes les taches de carbamazépine présentent une fluorescence extrêmement forte, qui n'est pratiquement jamais observée avec aucun autre ingrédient pharmaceutique actif.

### XIII. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

La tache de carbamazépine du chromatogramme obtenue avec la solution essai doit correspondre en termes de couleur, de taille, d'intensité, de forme et de distance de déplacement 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. 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 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. A des fins de documentation, prendre des photos de tous les résultats avec un appareil photo numérique ou d'un smartphone avec le flash désactivé.

# 7.115 Empaglifozine combiné ou non à la linagliptine

## Examen primaire du médicament via inspection physique

### I. INSPECTION PHYSIQUE

Lors de l'inspection visuelle, rechercher les anomalies d'étiquetage, d'emballage et de forme galénique comme décrit dans les premiers chapitres sur des méthodes et opérations générales du manuel principal, puis signaler les résultats. Prendre des photos, par exemple, avec un appareil photo de smartphone si possible. Chaque comprimé contient généralement 10 ou 25 mg d'empaglifozine. En cas d'association avec la linagliptine, le dosage est réduit à 5 ou 12,5 mg d'empaglifozine. Les associations

de metformine à dose fixe ne sont pas approuvées dans l'Union Européenne. Vérifier le poids total des comprimés ou le poids de remplissage des gélules à l'aide de la balance de poche électronique fournie. Toutes les formulations de comprimés ou de gélules d'empaglifozine à libération immédiate doivent également réussir le test de désintégration décrit au début du manuel principal. Ils doivent se désintégrer dans l'eau à 37 °C en moins de 30 minutes. Un échec d'un produit à libération immédiate représenterait une anomalie majeure.

### II. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

Les médicaments d'origine particulièrement bon marché, les produits pharmaceutiques dont les documents d'accompagnement sont incorrects ou manquants, dont la forme pharmaceutique ou l'emballage sont défectueux ou dont les étiquettes sont incomplètes, endommagées, manquantes ou rédigées dans une langue étrangère, ou encore les médicaments stockés dans de mauvaises conditions, doivent être soumis à un test de chromatographie sur couche mince.

## Vérification de l'identité et de la teneur en principe actif via le test de CCM

### I. PRINCIPE DU TEST

Associée ou non à la linagliptine, l'empaglifozine est extraite des comprimés ou des gélules à l'aide d'un volume connu de méthanol, puis son identité et sa teneur sont vérifiées par chromatographie sur couche mince (CCM) par rapport à un agent de référence approprié.

### II. EQUIPEMENT ET REACTIFS

- |  |  |
|--|--|
| 1) Pilon   | 14) Plaque chauffante  |
| 2) Feuille d'aluminium   | 15) Papier filtre  |
| 3) Entonnoir   | 16) Pair de ciseaux  |
| 4) Spatule   | 17) Pair de pincettes  |
| 5) Bande adhésive  | 18) Lampe UV de 254 nm   |
| 6) Stylo feutre  | 19) Toluène  |
| 7) Crayon et règle gradué  | 20) Méthanol   |
| 8) Fioles de verre de 10 ml  | 21) Butan-1-ol   |
| 9) Kit de pipettes graduées (1 to 25 ml)   | 22) Acétate d'éthyle   |
| 10) Kit de flacons de verre de laboratoire (25 to 100 ml)  | 23) Solution d'ammoniaque 25%  |
| 11) Plaques d'aluminium CCM Merck pré-enduites au gel de silice 60 F <sub>254</sub> taille 5 x 10 cm | 24) Solution d'acide acétique 96%  |
| 12) Tubes capillaire de verre de 2 µl de capacité  | 25) Solution d'acide sulfurique 96%                                      |
| 13) Cuve chromatographique (récipient de 500 ml)   | 26) Eau distillée/du robinet/embouteillée                                |
|  | 27) Substance témoin, par exemple, des comprimés d'empaglifozine à 25 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 25 mg d'empaglifozine. 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 25 ml et faire écouler tous les résidus solides à l'aide de 10 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée. Fermer le flacon de laboratoire et agiter pendant environ trois minutes jusqu'à ce que la plupart des solides soient dissous. Laisser reposer la solution pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que les résidus non dissous se déposent au fond du flacon. La solution obtenue doit contenir 2,5 mg d'empaglifozine total par ml et être étiquetée comme 'Solution Témoin du Stock d'Empaglifozine'. Ne préparer cette solution que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec le liquide surnageant clair ou même trouble.



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

La solution témoin du stock ne nécessite aucune dilution supplémentaire. Elle représente déjà la concentration finale de travail de 2,5 mg d'empaglifozine total par ml. Pour une manipulation plus pratique, une partie du liquide surnageant peut être transférée dans un nouveau flacon de 10 ml.

Cette solution témoin constitue un médicament de bonne qualité contenant 100% d'empaglifozine.

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

A l'aide des pipettes graduées, introduire 2 ml de la solution témoin du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 0,5 ml de méthanol. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 2 mg d'empaglifozine total par ml et être étiquetée comme '*Solution Témoin du Travail d'Empaglifozine 80%*'.

Cette solution témoin représente un médicament de basse qualité contenant seulement 80% de la quantité d'empaglifozine indiquée sur l'étiquette du produit. Dans la recherche présente, ce niveau de teneur en substance active constitue la limite la plus basse acceptable pour un produit pharmaceutique donné. Les limites des pharmacopées ne s'appliquent pas dans notre contexte.

VI. PREPARATION DE LA SOLUTION  
ESSAI DU STOCK D'UN  
MEDICAMENT DECLARANT UNE  
TENEUR EN EMPAGLIFOZINE DE  
5 MG PAR UNITE

Prendre deux comprimés ou deux gélules entières d'un médicament approprié prélevé en magasin ou sur le marché. Comme d'habitude, les comprimés sont enveloppés dans une feuille d'aluminium et réduits en fine poudre à l'aide d'un pilon. Introduire toute la poudre obtenue dans un flacon de laboratoire de 25 ml. La poudre obtenue à partir des gélules doit être placée directement dans un flacon ajoutant aussi les quatre parties vides d'enveloppe de gélule à la fin. Pour l'extraction, ajouter 4 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée appropriée. Fermer 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.

10 MG D'EMPAGLIFOZINE PAR  
UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml, ajouter 4 ml de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire l'empaglifozine. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

12,5 MG D'EMPAGLIFOZINE PAR  
UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml, ajouter 5 ml de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire l'empaglifozine. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

25 MG D'EMPAGLIFOZINE PAR  
UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml, ajouter 10 ml de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire l'empaglifozine. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

Associée ou non à la linagliptine, toutes les solutions essai du stock obtenues doivent finalement contenir 2,5 mg d'empaglifozine total par ml et être étiquetées comme '*Solution Essai du Stock d'Empaglifozine*'. Ne préparer ces solutions que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec les liquides surnageants clairs ou troubles.

VII. PREPARATION DE LA SOLUTION  
ESSAI D'USAGE

Les solutions essai du stock ne nécessitent pas de dilution supplémentaire. Elles constituent déjà la concentration de travail de 2,5 mg d'empaglifozine par ml. Quand elle est préparée sur la base d'un produit de haute qualité, la solution essai doit égaler la concentration d'empaglifozine de la solution témoin du travail supérieure produite ci-dessus. Pour faciliter la manipulation, une partie du liquide surnageant peut être transférée dans un flacon de 10 ml.

### 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 ou aux différentes concentrations et combinaisons de médicaments dans les solutions essai. 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.

Enfin, sécher les dépôts en plaçant la plaque CCM sur la plaque chauffante active pendant environ 15 secondes.

### IX. DEVELOPPEMENT DU CHROMATOGRAMME

À l'aide des pipettes graduées appropriées, ajouter 11 ml d'acétate d'éthyle, 7 ml de méthanol, 1 ml de toluène et 1 ml de solution d'ammoniaque à 25% dans le récipient utilisé en tant que cuve chromatographique. Cette phase mobile «A» développe rapidement la plaque CCM. Une autre phase mobile «B» composée de 12 ml de butanol-1-ol, 6 ml d'eau et 3 ml de solution d'acide acétique à 96 % est plus lente et nécessite environ le double de temps pour le développement de la plaque CCM. Mais cela permet d'obtenir plus d'informations sur l'identité et le contenu. Après la préparation de la phase mobile, fermer la chambre à chaque fois et mélanger soigneusement. 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. Placer avec précaution la plaque CCM chargée dans la cuve et fermer avec le bouchon à vis. Laisser le front du solvant se déplacer sur une longueur correspondant aux trois-quart de la plaque environ; la durée du développement étant d'environ 15 minutes pour la phase mobile «A» et d'environ 40 minutes pour la phase mobile «B». Retirer la plaque de la cuve, marquer le niveau atteint par le front du solvant au moyen d'un trait fin, puis faire sécher doucement tous les résidus de solvant. Pour ce faire, tenir la plaque chromatographique avec la paire de pincettes dans le flux d'air chaud directement au-dessus de la plaque chauffante pendant environ deux minutes. Secouer constamment la plaque CCM et chaque fois que la chromatoplaquette se déplace vers le bas, sa face inférieure peut toucher la surface de la plaque chauffante pendant quelques fractions de seconde.

### X. REVELATION DES TACHES

Après avoir séché tous les résidus de solvant, observer la plaque de chromatographie sous une lumière UV à 254 nm avec la lampe alimentée par batterie fournie. Pour mieux identifier et quantifier l'empaglifozine, colorer le chromatoplate frais avec de l'acide sulfurique et chauffer. Pour ce faire, remplir le bécher en plastique de 250 ml fourni avec 190 ml de méthanol, suivis de 10 ml de solution d'acide sulfurique à 96 %, et mélanger soigneusement. Laisser refroidir le mélange et immerger la plaque de chromatographie dans la solution de coloration, en commençant par la face inférieure. Retirer immédiatement la plaque de la solution et laisser l'excès de liquide s'écouler sur une serviette en papier. Essuyer le liquide restant au dos de la plaque et sécher l'ensemble de la solution de coloration pendant environ 30 à 60 secondes à la température maximale sur la plaque chauffante fournie. Après avoir retiré la plaque chromatographique de la plaque chauffante, observer la plaque colorée à la lumière du jour.

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

Phase mobile «A»: Une très faible tache à une distance de migration relative d'environ 0,43 indique la présence d'empaglifozine dans la solution essai. Lorsqu'elle est combinée à la linagliptine, une tache forte supplémentaire apparaît au-dessus de l'empaglifozine avec une valeur de rapport frontal d'environ 0,63. Le lactose reste sur la ligne d'origine et le mannitol reste invisible à une distance de déplacement d'environ 0,10 ou moins.

Phase mobile «B»: Une très faible tache à une distance de migration relative d'environ 0,69 indique la présence d'empaglifozine dans la solution essai. Lorsqu'elle est combinée à la linagliptine, une tache forte supplémentaire apparaît au-dessous l'empaglifozine avec une

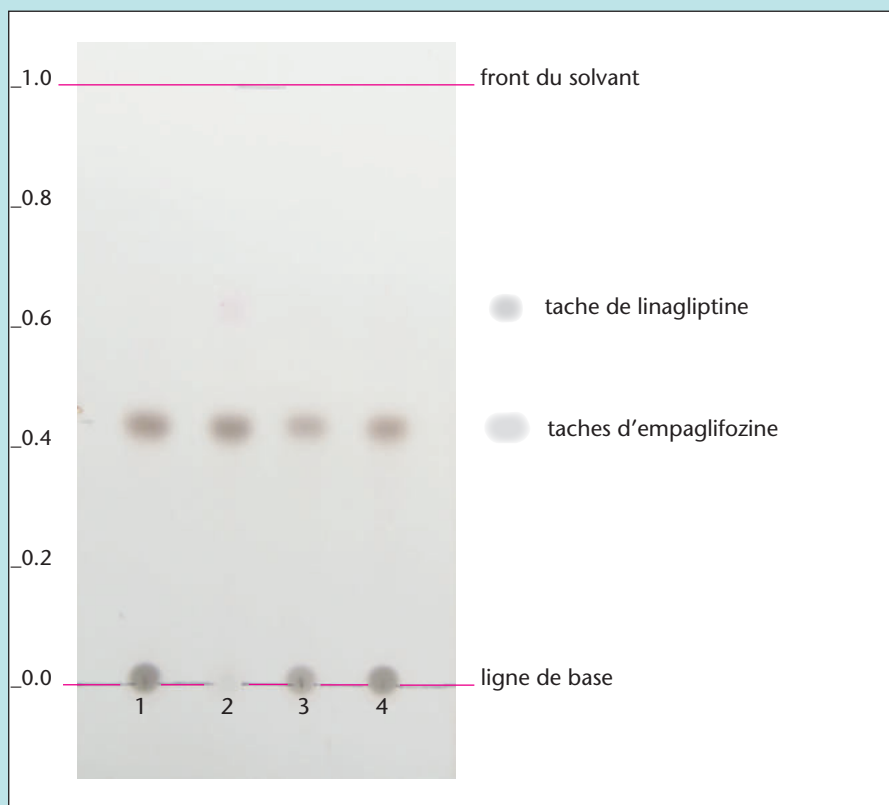
CHROMATOGRAMME PROVENANT DE LA PHASE MOBILE «A» OBSERVE A LA LUMIERE DU JOUR APRES COLORATION A L'ACIDE SULFURIQUE

Développement. n° 1:  
Solution témoin supérieure représentant 100% d'empaglifozine total

Développement. n° 2:  
Une association de linagliptine à dose fixe de bonne qualité avec une teneur acceptable en empaglifozine

Développement. n° 3:  
Un médicament monodosé de basse qualité à teneur faible inacceptable en empaglifozine

Développement. n° 4:  
Solution témoin inférieure représentant 80% d'empaglifozine total



valeur de rapport frontal d'environ 0,41. Avec cette phase mobile, le lactose présente une distance de déplacement d'environ 0,14 et le mannitol d'environ 0,25 en cas de détection différente.

## XII. OBSERVATIONS A LA LUMIERE DU JOUR APRES COLORATION A L'ACIDE SULFURIQUE

Lorsque les plaques chromatographiques des deux phases mobiles sont colorées à chaud avec de l'acide sulfurique, toutes les taches d'empaglifozine deviennent gris-noir et sont visibles à la lumière du jour. Les taches de linagliptine restent invisibles ou deviennent légèrement roses. Les taches fortes supplémentaires générées par la solution essai indiqueraient d'autres médicaments ou une dégradation d'empaglifozine, ce dernier cas étant plus probable lorsqu'il est associé à une tache principale plus petite. Une tache principale plus petite de la solution essai peut également indiquer une faible teneur en empaglifozine et s'il n'y a aucune tache, cela signifierait une absence totale d'empaglifozine. Les agents auxiliaires incorporés dans les différents produits finis peuvent provoquer des taches nulles, faibles ou partiellement fortes qui remontent jusqu'au front du solvant ou qui s'attardent près de la ligne d'origine ou sur celle-ci. Par exemple, le lactose forme une forte coloration à cet endroit et deviendra visible. Contrairement au lactose, le mannitol est à peine visible ici mais présente une fluorescence extrêmement faible lorsque la plaque CCM colorée est en outre exposée à un rayonnement UV de 366 nm.

## XIII. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

La tache d'empaglifozine du chromatogramme obtenue avec la solution essai doit correspondre en termes de couleur, de taille, d'intensité, de forme et de distance de déplacement 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. 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 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. A des fins de documentation, prendre des photos de tous les résultats avec un appareil photo numérique ou d'un smartphone avec le flash désactivé.

## Examen primaire du médicament via inspection physique

### I. INSPECTION PHYSIQUE

Lors de l'inspection visuelle, rechercher les anomalies d'étiquetage, d'emballage et de forme galénique comme décrit dans les premiers chapitres sur des méthodes et opérations générales du manuel principal, puis signaler les résultats. Prendre des photos, par exemple, avec un appareil photo de smartphone si possible. Chaque comprimé soluble ou à libération contrôlée contient généralement 30, 60 ou 80 mg de gliclazide. D'autres dosages et coformulations de metformine sont connus pour exister. Vérifier

le poids total des comprimés ou le poids de remplissage des gélules à l'aide de la balance de poche électronique fournie. Toutes les formulations de comprimés ou de gélules de gliclazide à libération immédiate doivent également réussir le test de désintégration décrit au début du manuel principal. Ils doivent se désintégrer dans l'eau à 37 °C en moins de 30 minutes. Un échec d'un produit à libération immédiate représenterait une anomalie majeure.

### II. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

Les médicaments d'origine particulièrement bon marché, les produits pharmaceutiques dont les documents d'accompagnement sont incorrects ou manquants, dont la forme pharmaceutique ou l'emballage sont défectueux ou dont les étiquettes sont incomplètes, endommagées, manquantes ou rédigées dans une langue étrangère, ou encore les médicaments stockés dans de mauvaises conditions, doivent être soumis à un test de chromatographie sur couche mince.

## Vérification de l'identité et de la teneur en principe actif via le test de CCM

### I. PRINCIPE DU TEST

Associé ou non au chlorhydrate de metformine, le gliclazide est extrait des comprimés ou des gélules à l'aide d'un volume connu d'acétone, puis son identité et sa teneur sont vérifiées par chromatographie sur couche mince (CCM) par rapport à un agent de référence approprié. Pour une vérification rapide de la qualité de la metformine, reporter au protocole correspondant.

### II. EQUIPEMENT ET REACTIFS

- |  |  |
|--|--|
| 1) Pilon   | 13) Cuve chromatographique (récipient de 500 ml)                       |
| 2) Feuille d'aluminium   | 14) Plaque chauffante  |
| 3) Entonnoir   | 15) Papier filtre  |
| 4) Spatule   | 16) Pair de ciseaux  |
| 5) Bande adhésive  | 17) Pair de pincettes  |
| 6) Stylo feutre  | 18) Lampe UV de 254 nm   |
| 7) Crayon et règle gradué  | 19) Cuve de révélation à l'iode  |
| 8) Fioles de verre de 10 ml  | 20) Ninhydrine   |
| 9) Kit de pipettes graduées (1 to 25 ml)   | 21) Acétone  |
| 10) Kit de flacons de verre de laboratoire (25 to 100 ml)  | 22) Méthanol   |
| 11) Plaques d'aluminium CCM Merck pré-enduites au gel de silice 60 F <sub>254</sub> taille 5 x 10 cm | 23) Acétate d'éthyle   |
| 12) Tubes capillaire de verre de 2 µl de capacité  | 24) Solution d'ammoniacque 25%   |
|  | 25) Solution d'acide acétique 96%                                      |
|  | 26) Substance témoin, par exemple, des comprimés de gliclazide à 60 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 à une seule dose contenant 60 mg de gliclazide. 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 25 ml et faire écouler tous les résidus solides à l'aide de 6 ml de acétone en utilisant une pipette graduée. Fermer le flacon de laboratoire et agiter pendant environ trois minutes jusqu'à ce que la plupart des solides soient dissous. Laisser reposer la solution pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que les résidus non dissous se déposent au fond du flacon. La solution obtenue doit contenir 10 mg de gliclazide total par ml et être étiquetée comme '*Solution Témoin du Stock de Gliclazide*'. Ne préparer cette solution que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec le liquide surnageant clair ou même trouble.

<p>IV. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN D'USAGE 100% (LIMIT 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 d'acétone. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 2,5 mg de substance active totale par ml et être étiquetée comme '<i>Solution Témoin du Travail de Gliclazide 100%</i>'.</p> <p>Cette solution témoin constitue un médicament de bonne qualité contenant 100% de gliclazide.</p>
<p>V. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN D'USAGE 80% (LIMIT 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 d'acétone. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 2 mg de gliclazide total par ml et être étiquetée comme '<i>Solution Témoin du Travail de Gliclazide 80%</i>'.</p> <p>Cette solution témoin représente un médicament de basse qualité contenant seulement 80% de la quantité de gliclazide indiquée sur l'étiquette du produit. Dans la recherche présente, ce niveau de teneur en substance active constitue la limite la plus basse acceptable pour un produit pharmaceutique donné. Les limites des pharmacopées ne s'appliquent pas dans notre contexte.</p>
<p>VI. PREPARATION DE LA SOLUTION ESSAI DU STOCK D'UN MEDICAMENT DECLARANT UNE TENEUR EN GLICLAZIDE DE 30 MG PAR UNITE</p> <p>60 MG OF GLICLAZIDE PER UNIT</p> <p>80 MG DE GLICLAZIDE PAR UNITE</p>	<p>Prendre un comprimé ou une gélule entière d'un médicament approprié échantillonné sur le terrain. Comme d'habitude, les comprimés sont enveloppés dans une feuille d'aluminium et réduits en fine poudre à l'aide d'un pilon. Introduire toute la poudre obtenue dans un flacon de laboratoire de 10 ou 25 ml. La poudre obtenue à partir des gélules doit être placée directement dans un flacon ajoutant aussi les deux parties vides d'enveloppe de gélule à la fin. Pour l'extraction, ajouter 3 ml d'acétone en utilisant une pipette graduée appropriée. Fermer 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.</p> <p>Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml, ajouter 6 ml d'acétone à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire le gliclazide. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.</p> <p>Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml, ajouter 8 ml d'acétone à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire le gliclazide. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.</p> <p>En association ou non avec le chlorhydrate de metformine, toutes les solutions essai du stock obtenues doivent finalement contenir 10 mg de gliclazide total par ml et être étiquetées comme '<i>Solution Essai du Stock de Gliclazide</i>'. Ne préparer ces solutions que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec les liquides surnageants clairs ou troubles.</p>
<p>VII. PREPARATION DE LA SOLUTION ESSAI D'USAGE</p>	<p>A l'aide des pipettes graduées, introduire 1 ml de la solution essai du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 3 ml d'acétone. Fermer la fiole, agiter et étiqueter comme '<i>Solution Essai d'Usage de Gliclazide</i>'.</p> <p>La concentration attendue de gliclazide dans cette solution essai de travail est de 2,5 mg par ml et doit correspondre à la concentration de gliclazide de la solution témoin du travail supérieure produite ci-dessus.</p>
<p>VIII. DEPOT D'ECHANTILLON</p>	<p>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 suivante, en utilisant les tubes capillaires fournis.</p> <p>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</p>

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 ou aux différentes concentrations et combinaisons de médicaments dans les solutions essai. 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.

Sécher délicatement les dépôts. Pour ce faire, tenir la plaque chromatographique avec la paire de pincettes dans le flux d'air chaud directement au-dessus de la plaque chauffante pendant environ 15 secondes. Secouer constamment la plaque CCM et chaque fois que la chromatoplaquette se déplace vers le bas, sa face inférieure peut toucher la surface de la plaque chauffante pendant quelques fractions de seconde.

#### IX. DEVELOPPEMENT DU CHROMATOGRAMME

À l'aide des pipettes graduées appropriées, ajouter 15 ml d'acétate d'éthyle, 5 ml de méthanol et 1 ml de solution d'ammoniaque à 25% dans le récipient utilisé en tant que cuve chromatographique. Fermer la cuve et mélanger soigneusement. 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. Placer avec précaution la plaque CCM chargée dans la cuve et fermer avec le bouchon à vis. Laisser le front du solvant se déplacer sur une longueur correspondant aux trois-quarts de la plaque environ; la durée du développement étant d'environ 13 minutes. Retirer la plaque de la cuve, marquer le niveau atteint par le front du solvant au moyen d'un trait fin, puis faire sécher doucement tous les résidus de solvant. Pour ce faire, tenir la plaque chromatographique avec la paire de pincettes dans le flux d'air chaud directement au-dessus de la plaque chauffante pendant environ deux minutes. Secouer constamment la plaque CCM et chaque fois que la chromatoplaquette se déplace vers le bas, sa face inférieure peut toucher la surface de la plaque chauffante pendant quelques fractions de seconde.

#### X. REVELATION DES TACHES

Après avoir séché tous les résidus de solvant, observer la plaque de chromatographie sous une lumière UV à 254 nm avec la lampe alimentée par batterie fournie. Pour une identification et une quantification plus poussées de gliclazide, colorer la plaque chromatographique avec de l'iode dans la chambre à iode et avec de la ninhydrine sur la plaque chauffante.

S'il n'y a qu'un résidu d'iode minime sur la plaque, la plaque d'iode peut être utilisée pour la coloration à la ninhydrine. S'il y a beaucoup d'iode sur la plaque chromatographique, l'iode peut être éliminé en chauffant légèrement la plaque CCM. Pour la coloration ultérieure, peser 3 g de ninhydrine (environ 10 fois une spatule bien remplie) et les dissoudre dans un mélange de 150 ml de méthanol et de 30 ml de solution d'acide acétique 96% à l'aide du bécher de 250 ml fourni. Cela permettra de plonger la plaque chromatographique, le côté inférieur en premier, dans la solution de coloration à l'aide d'une paire pincettes. Retirer instantanément la plaque du bécher, laisser couler l'excédent de solution sur du papier absorbant et enfin sécher le dos de la plaque en utilisant à nouveau du papier absorbant. Continuer à sécher toute la solution de coloration sur une plaque chaude et observer comment les taches de gliclazide deviennent progressivement visibles. Le processus de coloration à la ninhydrine est illustré à la page 36 du manuel principal. Noter que la peau contaminée avec une solution de ninhydrine sera également tachée. Toutefois, cela n'est pas dangereux pour la santé et les taches violettes disparaîtront au bout d'un jour ou deux.

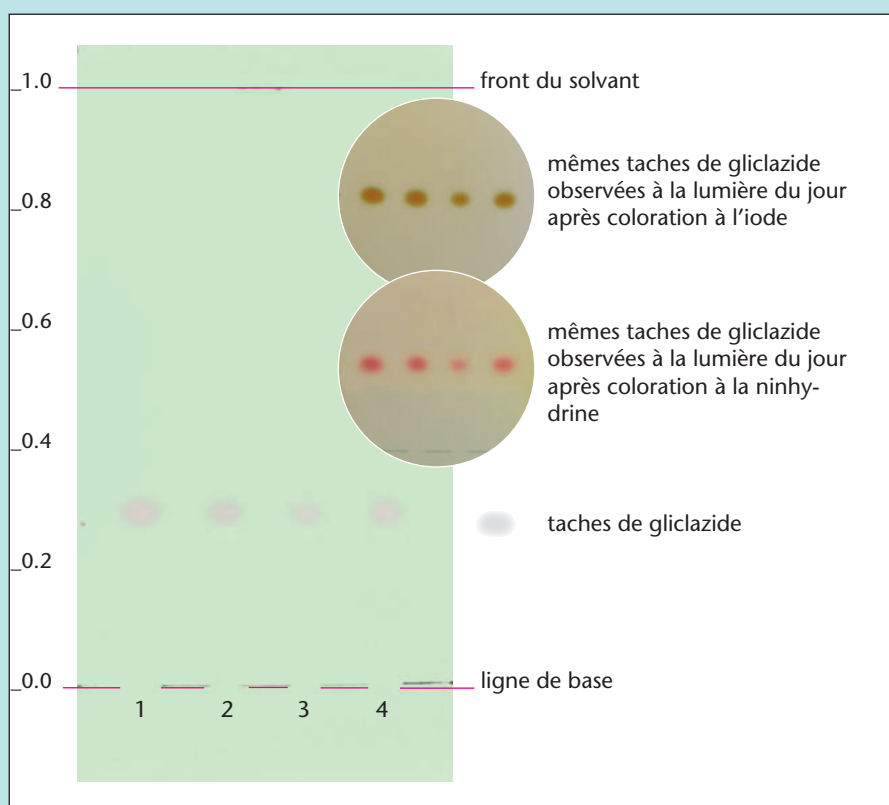
#### XI. OBSERVATIONS A LA LUMIERE UV DE 254 NM

Une tache faible à une distance de déplacement d'environ 0,29 indique la présence de gliclazide dans la solution essai. Car le chlorhydrate de metformine étant insoluble dans l'acétone, aucune deuxième tache n'est visible dans les solutions de test provenant des coformulations de metformine. Toute metformine résiduelle resterait à la ligne d'origine. Les taches fortes supplémentaires générées par la solution essai indiqueraient d'autres médicaments ou une dégradation du gliclazide, ce dernier cas étant plus probable lorsqu'il est associé à une tache principale plus petite. Une tache principale plus petite de la solution



## CHROMATOGRAMME OBSERVE A LA LUMIERE UV DE 254 NM

- Développement. n° 1:  
Solution témoin supérieure représentant 100% de gliclazide total
- Développement. n° 2:  
Un médicament de bonne qualité à teneur acceptable en gliclazide
- Développement. n° 3:  
Un médicament de basse qualité à teneur faible inacceptable en gliclazide
- Développement. n° 4:  
Solution témoin inférieure représentant 80% de gliclazide total



essai peut également indiquer une faible teneur en gliclazide et s'il n'y a aucune tache, cela signifierait une absence totale de gliclazide. Les agents auxiliaires incorporés dans différents produits finis peuvent provoquer des taches légères ou quasi inexistantes se déplaçant le long du front des solvants ou émergeant près ou sur la ligne de base.

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

Lorsque la plaque de chromatographie est colorée à l'iode, toutes les taches de gliclazide précédemment observées à 254 nm deviennent brun-orange et deviennent visibles à la lumière du jour. La coloration à l'iode est déjà forte à la lumière du jour et la performance devient encore plus forte lorsque la plaque CCM est à nouveau irradiée avec une lumière UV de 254 nm.

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

Une fois que l'iode restant a été éliminé de la plaque CCM par chauffage, une nouvelle coloration à la ninhydrine peut commencer. Toutes les taches de gliclazide deviennent alors rouge-rose sous l'effet de la chaleur, de même que l'arrière-plan de chromatoplaquette, bien que les deux colorations aient heureusement des nuances et des intensités différentes.

### XIV. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

La tache de gliclazide du chromatogramme obtenue avec la solution essai doit correspondre en termes de couleur, de taille, d'intensité, de forme et de distance de déplacement 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. 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 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. A des fins de documentation, prendre des photos de tous les résultats avec un appareil photo numérique ou d'un smartphone avec le flash désactivé.

# 7.117 Glimépiride

## Examen primaire du médicament via inspection physique

### I. INSPECTION PHYSIQUE

Lors de l'inspection visuelle, rechercher les anomalies d'étiquetage, d'emballage et de forme galénique comme décrit dans les premiers chapitres sur des méthodes et opérations générales du manuel principal, puis signaler les résultats. Prendre des photos, par exemple, avec un appareil photo de smartphone si possible. Chaque comprimé ou gélule contient généralement 1, 2, 3, 4 ou 6 mg de glimépiride. Le glimépiride peut être associé à la metformine en ajoutant 500 ou même 1000 mg de sel de chlorhydrate de metformine à la formulation du comprimé

ou de la gélule. Des coformulations avec d'autres agents antidiabétiques, par exemple la pioglitazone sont connus pour exister. Vérifier le poids total des comprimés ou le poids de remplissage des gélules à l'aide de la balance de poche électronique fournie. Toutes les formulations de comprimés ou de gélules de glimépiride à libération immédiate doivent également réussir le test de désintégration décrit au début du manuel principal. Ils doivent se désintégrer dans l'eau à 37 °C en moins de 30 minutes. Un échec d'un produit à libération immédiate représenterait une anomalie majeure.

### II. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

Les médicaments d'origine particulièrement bon marché, les produits pharmaceutiques dont les documents d'accompagnement sont incorrects ou manquants, dont la forme pharmaceutique ou l'emballage sont défectueux ou dont les étiquettes sont incomplètes, endommagées, manquantes ou rédigées dans une langue étrangère, ou encore les médicaments stockés dans de mauvaises conditions, doivent être soumis à un test de chromatographie sur couche mince.

## Vérification de l'identité et de la teneur en principe actif via le test de CCM

### I. PRINCIPE DU TEST

Le glimépiride est extrait des comprimés ou des gélules à l'aide d'un volume connu de solution de méthanol ammoniacal, puis son identité et sa teneur sont vérifiées par chromatographie sur couche mince (CCM) par rapport à un agent de référence approprié. Il convient de noter qu'en raison du rapport défavorable entre le glimépiride et le chlorhydrate de metformine (souvent de 1:500 à 1:1000), les coformulations correspondantes ne peuvent pas être traitées par cette méthode. Pour des raisons pratiques uniquement, la petite quantité de liquide nécessaire à l'extraction du glimépiride est souvent complètement absorbée par la poudre obtenue à partir des comprimés combinés lourds. En outre, en raison de la déformation légère des taches, la quantification du glimépiride à partir de combinaisons de metformine à dose fixe est plus que difficile. Cependant, la préparation des échantillons et les résultats parfaits du dosage par CCM des monoformulations de glimépiride ne posent pas de problème. Pour un contrôle rapide de la qualité de la metformine, référer au protocole correspondant.

### II. EQUIPEMENT ET REACTIFS

- |  |  |
|--|--|
| 1) Pilon   | 13) Cuve chromatographique (récipient de 500 ml)                       |
| 2) Feuille d'aluminium   | 14) Plaque chauffante  |
| 3) Entonnoir   | 15) Papier filtre  |
| 4) Spatule   | 16) Pair de ciseaux  |
| 5) Bande adhésive  | 17) Pair de pincettes  |
| 6) Stylo feutre  | 18) Lampe UV de 254 nm   |
| 7) Crayon et règle gradué  | 19) Toluène  |
| 8) Fioles de verre de 10 ml  | 20) Méthanol   |
| 9) Kit de pipettes graduées (1 to 25 ml)   | 21) Acétate d'éthyle   |
| 10) Kit de flacons de verre de laboratoire (25 to 100 ml)  | 22) Solution d'ammoniaque 25%  |
| 11) Plaques d'aluminium CCM Merck pré-enduites au gel de silice 60 F <sub>254</sub> taille 5 x 10 cm | 23) Substance témoin, par exemple, des comprimés de glimépiride à 6 mg |
| 12) Tubes capillaire de verre de 2 µl de capacité  |  |

### III. PREPARATION DU SOLVANT D'EXTRACTION

Pour obtenir la solution ammoniacale de méthanol pour l'extraction du glimépiride, travailler avec un mélange d'une partie de solution d'ammoniaque à 25 % et de 39 parties de méthanol. Lorsque l'on travaille avec deux échantillons seulement, la quantité totale de solution

ammoniacale de méthanol nécessaire pour préparer les solutions de témoin et d'essai ne dépasse pas 20 ml. Pour ce faire, mélanger 0,5 ml de solution d'ammoniaque à 25 % avec 19,5 ml de méthanol. Pour chaque échantillon supplémentaire, préparer 2 à 6 ml de liquide d'extraction en plus.

#### IV. 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 à une seule dose contenant 6 mg de glimépiride. 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 10 ou 25 ml et faire écouler tous les résidus solides à l'aide de 6 ml de la solution ammoniacale de méthanol en utilisant une pipette graduée. Fermer le flacon de laboratoire et agiter pendant environ trois minutes jusqu'à ce que la plupart des solides soient dissous. Laisser reposer la solution pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que les résidus non dissous se déposent au fond du flacon. La solution obtenue doit contenir 1 mg de glimépiride total par ml et être étiquetée comme '*Solution Témoin du Stock de Glimépiride*'. Ne préparer cette solution que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec le liquide surnageant clair ou même trouble.

#### V. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN D'USAGE 100% (LIMIT SUPERIEURE)

La solution témoin du stock ne nécessite aucune dilution supplémentaire. Elle représente déjà la concentration finale de travail de 1 mg de glimépiride total par ml. Pour une manipulation plus pratique, une partie du liquide surnageant peut être transférée dans un nouveau flacon de 10 ml.

Cette solution témoin constitue un médicament de bonne qualité contenant 100% de glimépiride.

#### VI. PREPARATION DE LA SOLUTION TEMOIN D'USAGE 80% (LIMIT INFERIEURE)

A l'aide des pipettes graduées, introduire 2 ml de la solution témoin du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 0,5 ml de la solution ammoniacale de méthanol. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 0,8 mg de glimépiride total par ml et être étiquetée comme '*Solution Témoin du Travail de Glimépiride 80%*'.

Cette solution témoin représente un médicament de basse qualité contenant seulement 80% de la quantité de glimépiride indiquée sur l'étiquette du produit. Dans la recherche présente, ce niveau de teneur en substance active constitue la limite la plus basse acceptable pour un produit pharmaceutique donné. Les limites des pharmacopées ne s'appliquent pas dans notre contexte.

#### VII. PREPARATION DE LA SOLUTION ESSAI DU STOCK D'UN MEDICAMENT DECLARANT UNE TENEUR EN GLIMÉPIRIDE DE 1 MG PAR UNITE

Prendre deux comprimés ou gélules entières d'un médicament approprié échantillonné sur le terrain. Comme d'habitude, les comprimés sont enveloppés dans une feuille d'aluminium et réduits en fine poudre à l'aide d'un pilon. Introduire toute la poudre obtenue dans un flacon de laboratoire de 10 ou 25 ml. La poudre obtenue à partir des gélules doit être placée directement dans un flacon ajoutant aussi les quatre parties vides d'enveloppe de gélule à la fin. Pour l'extraction, ajouter 2 ml de la solution ammoniacale de méthanol en utilisant une pipette graduée appropriée. Fermer 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.

##### 2 MG DE GLIMÉPIRIDE PAR UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 10 ou 25 ml, ajouter 2 ml de la solution ammoniacale de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire le glimépiride. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

##### 3 MG DE GLIMÉPIRIDE PAR UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 10 ou 25 ml, ajouter 3 ml de la solution ammoniacale de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire le glimépiride. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

**4 MG DE GLIMÉPIRIDE PAR UNITÉ**

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 10 ou 25 ml, ajouter 4 ml de la solution ammoniacale de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire le glimépiride. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

**6 MG DE GLIMÉPIRIDE PAR UNITÉ**

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 10 ou 25 ml, ajouter 6 ml de la solution ammoniacale de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire le glimépiride. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

En association ou non avec d'autres agents antidiabétiques, toutes les solutions essai du stock obtenues doivent finalement contenir 1 mg de glimépiride total par ml et être étiquetées comme '*Solution Essai du Stock de Glimépiride*'. Ne préparer ces solutions que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec les liquides surnageants clairs ou troubles.

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

Les solutions essai du stock ne nécessitent pas de dilution supplémentaire. Elles constituent déjà la concentration de travail de 1 mg de glimépiride par ml. Quand elle est préparée sur la base d'un produit de haute qualité, la solution essai doit égaler la concentration de glimépiride de la solution témoin du travail supérieure produite ci-dessus. Pour faciliter la manipulation, une partie du liquide surnageant peut être transférée dans un flacon de 10 ml.

**IX. 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 ou aux différentes concentrations et combinaisons de médicaments dans les solutions essai. 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.

Sécher les taches. Pour ce faire, placer la chromatoplaquette sur la plaque chauffante pendant environ 10 secondes.

**X. DEVELOPPEMENT DU  
CHROMATOGRAMME**

À l'aide des pipettes graduées appropriées, ajouter 12 ml de toluène, 8 ml d'acétate d'éthyle, 4 ml de méthanol et 0,05 ml de solution d'ammoniaque à 25% dans le récipient utilisé en tant que cuve chromatographique. Fermer la cuve et mélanger soigneusement. 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. Placer avec précaution la plaque CCM chargée dans la cuve et fermer avec le bouchon à vis. Laisser le front du solvant se déplacer sur une longueur correspondant aux trois-quarts de la plaque environ; la durée du développement étant d'environ 12 minutes. Retirer la plaque de la cuve, marquer le niveau atteint par le front du solvant au moyen d'un trait fin, puis faire sécher doucement tous les résidus de solvant. Pour ce faire, tenir la plaque chromatographique avec la paire de pincettes dans le flux d'air chaud directement au-dessus de la plaque chauffante pendant environ deux minutes. Secouer constamment la plaque CCM et chaque fois que la chromatoplaquette se déplace vers le bas, sa face inférieure peut toucher la surface de la plaque chauffante pendant quelques fractions de seconde.

**XI. REVELATION DES TACHES**

Après avoir séché tous les résidus de solvant, observer la plaque de chromatographie sous une lumière UV à 254 nm avec la lampe alimentée par batterie fournie. Cette méthode de détection sera adaptée à l'identification et à la quantification du glimépiride.

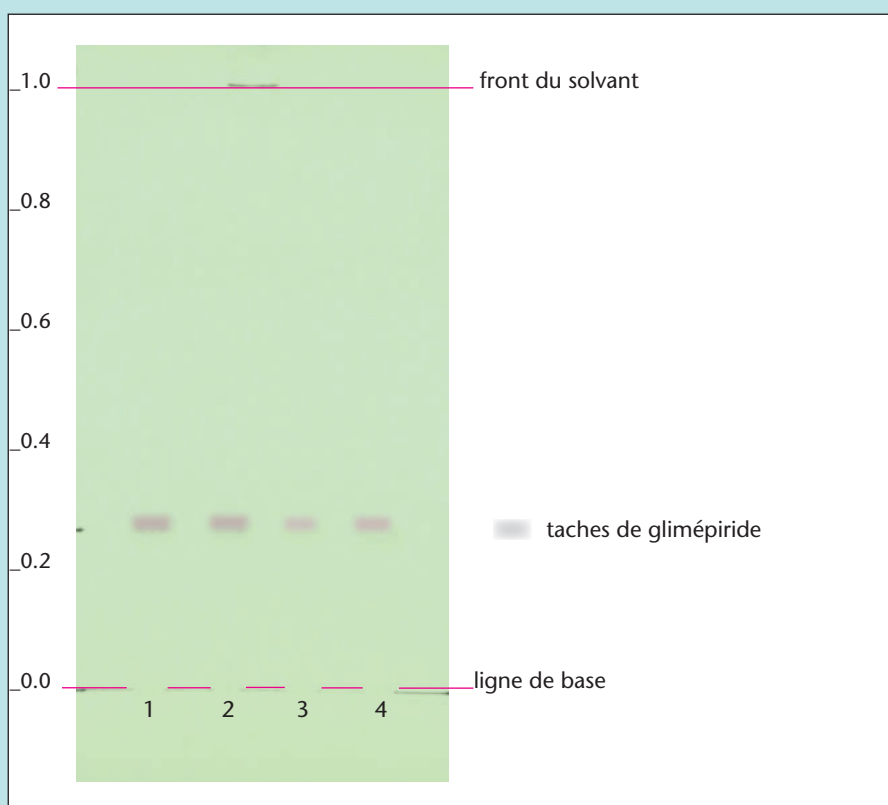
## CHROMATOGRAMME OBSERVE A LA LUMIERE UV DE 254 NM

Développement. n° 1:  
Solution témoin supérieure représentant  
100% de glimépiride total

Développement. n° 2:  
Un médicament monodosé de bonne qua-  
lité à teneur acceptable en glimépiride

Développement. n° 3:  
Un médicament monodosé de basse qualité  
à teneur faible inacceptable en glimépiride

Développement. n° 4:  
Solution témoin inférieure représentant  
80% de glimépiride total



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

Une tache sombre à une distance de déplacement d'environ 0,28 indique la présence de glimépiride dans la solution essai. En cas de combinaison avec le chlorhydrate de metformine, une tache de metformine apparaît sur la ligne d'origine, et en cas de combinaison supplémentaire avec la pioglitazone, une troisième tache avec une petite queue apparaît à une distance d'environ 0,38 directement au-dessus de la tache de glimépiride. La phase mobile composée d'une solution de toluène, d'acétate d'éthyle et d'acide acétique à 96 % (12:8:1 v/v), dans laquelle la pioglitazone se dépose sous le glimépiride et où la metformine se dépose à nouveau sur la ligne d'origine, peut être considérée comme légèrement meilleure pour la séparation. Les taches fortes supplémentaires générées par la solution essai indiqueraient d'autres médicaments ou une dégradation du glimépiride, ce dernier cas étant plus probable lorsqu'il est associé à une tache principale plus petite. Une tache principale plus petite de la solution essai peut également indiquer une faible teneur en glimépiride et s'il n'y a aucune tache, cela signifierait une absence totale de glimépiride. Les agents auxiliaires incorporés dans différents produits finis peuvent provoquer des taches légères ou quasi inexistantes se déplaçant le long du front des solvants ou émergeant près ou sur la ligne de base.

## XIII. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

La tache de glimépiride du chromatogramme obtenue avec la solution essai doit correspondre en termes de couleur, de taille, d'intensité, de forme et de distance de déplacement 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. 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 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. A des fins de documentation, prendre des photos de tous les résultats avec un appareil photo numérique ou d'un smartphone avec le flash désactivé.

## Examen primaire du médicament via inspection physique

### I. INSPECTION PHYSIQUE

Lors de l'inspection visuelle, rechercher les anomalies d'étiquetage, d'emballage et de forme galénique comme décrit dans les premiers chapitres sur des méthodes et opérations générales du manuel principal, puis signaler les résultats. Prendre des photos, par exemple, avec un appareil photo de smartphone si possible. Que la sitagliptine se présente sous forme de chlorhydrate, de phosphate, de tartrate, de fumarate ou de sel de malate, chaque comprimé contient généralement 25, 50 ou 100 mg de sitagliptine par base libre. La sitagliptine peut être

associée à la metformine en ajoutant 500, 850 ou 1000 mg de sel de chlorhydrate de metformine à la formulation du comprimé ou de la gélule. Vérifier le poids total des comprimés ou le poids de remplissage des gélules à l'aide de la balance de poche électronique fournie. Toutes les formulations de comprimés ou de gélules de sitagliptine à libération immédiate doivent également réussir le test de désintégration décrit au début du manuel principal. Ils doivent se désintégrer dans l'eau à 37 °C en moins de 30 minutes. Un échec d'un produit à libération immédiate représenterait une anomalie majeure.

### II. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

Les médicaments d'origine particulièrement bon marché, les produits pharmaceutiques dont les documents d'accompagnement sont incorrects ou manquants, dont la forme pharmaceutique ou l'emballage sont défectueux ou dont les étiquettes sont incomplètes, endommagées, manquantes ou rédigées dans une langue étrangère, ou encore les médicaments stockés dans de mauvaises conditions, doivent être soumis à un test de chromatographie sur couche mince.

## Vérification de l'identité et de la teneur en principe actif via le test de CCM

### I. PRINCIPE DU TEST

Associé ou non au chlorhydrate de metformine, la sitagliptine chlorhydrate/phosphate/tartrate/malate est extrait des comprimés ou des gélules avec un volume connu de méthanol et son identité et sa teneur sont ensuite vérifiées par chromatographie sur couche mince (CCM) par rapport à un agent de référence approprié. Pour un contrôle rapide de la qualité de la metformine, référer au protocole correspondant.

### II. EQUIPEMENT ET REACTIFS

- 1) Pilon
- 2) Feuille d'aluminium
- 3) Entonnoir
- 4) Spatule
- 5) Bande adhésive
- 6) Stylo feutre
- 7) Crayon et règle gradué
- 8) Fioles de verre de 10 ml
- 9) Kit de pipettes graduées (1 to 25 ml)
- 10) Kit de flacons de verre de laboratoire (25 to 100 ml)
- 11) Plaques d'aluminium CCM Merck pré-enduites au gel de silice 60 F<sub>254</sub> taille 5 x 10 cm
- 12) Tubes capillaire de verre de 2 µl de capacité
- 13) Cuve chromatographique (récipient de 500 ml)
- 14) Plaque chauffante
- 15) Papier filtre
- 16) Pair de ciseaux
- 17) Pair de pincettes
- 18) Lampe UV de 254 nm
- 19) Cuve de révélation à l'iode
- 20) Toluène
- 21) Méthanol
- 22) Acétate d'éthyle
- 23) Solution d'ammoniaque 25%
- 24) Substance témoin, par exemple, des comprimés de sitagliptine à 50 mg présentés sous forme de sel de phosphate monohydraté



### 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 à une seule dose contenant 50 mg de sitagliptine par base libre. 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 25 ml et faire écouler tous les résidus solides à l'aide de 10 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée. Fermer le flacon de laboratoire et agiter pendant environ trois minutes jusqu'à ce que la plupart des solides soient dissous. Laisser reposer la solution pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que les résidus non dissous se déposent au fond du flacon. La solution obtenue doit contenir 5 mg de sitagliptine totale par ml et être étiquetée comme '*Solution Témoin du Stock de Sitagliptine*'. Ne préparer cette solution que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec le liquide surnageant clair ou même trouble.

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

La solution témoin du stock ne nécessite aucune dilution supplémentaire. Elle représente déjà la concentration finale de travail de 5 mg de sitagliptine totale par ml. Pour une manipulation plus pratique, une partie du liquide surnageant peut être transférée dans un nouveau flacon de 10 ml.

Cette solution témoin constitue un médicament de bonne qualité contenant 100% de sitagliptine.

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

A l'aide des pipettes graduées, introduire 2 ml de la solution témoin du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 0,5 ml de méthanol. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 4 mg de sitagliptine totale par ml et être étiquetée comme '*Solution Témoin du Travail de Sitagliptine 80%*'.

Cette solution témoin représente un médicament de basse qualité contenant seulement 80% de la quantité de sitagliptine indiquée sur l'étiquette du produit. Dans la recherche présente, ce niveau de teneur en substance active constitue la limite la plus basse acceptable pour un produit pharmaceutique donné. Les limites des pharmacopées ne s'appliquent pas dans notre contexte.

### VI. PREPARATION DE LA SOLUTION ESSAI DU STOCK D'UN MEDICAMENT DECLARANT UNE TENEUR EN SITAGLIPTINE DE 25 MG PAR UNITE

Prendre un comprimé ou une gélule entière d'un médicament approprié échantillonné sur le terrain. Comme d'habitude, les comprimés sont enveloppés dans une feuille d'aluminium et réduits en fine poudre à l'aide d'un pilon. Introduire toute la poudre obtenue dans un flacon de laboratoire de 25 ml. La poudre obtenue à partir des gélules doit être placée directement dans un flacon ajoutant aussi les deux parties vides d'enveloppe de gélule à la fin. Pour l'extraction, ajouter 5 ml de méthanol en utilisant une pipette graduée appropriée. Fermer 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.

#### 50 MG DE SITAGLIPTINE PAR UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml, ajouter 10 ml de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire la sitagliptine. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

#### 100 MG DE SITAGLIPTINE PAR UNITE

Placer la poudre obtenue à partir d'un échantillon entier de comprimé ou de gélule dans un flacon de verre de laboratoire de 25 ml, ajouter 20 ml de méthanol à l'aide d'une pipette graduée appropriée et extraire la sitagliptine. Poursuivre le travail comme décrit ci-dessus.

En association ou non avec le chlorhydrate de metformine, toutes les solutions essai du stock obtenues doivent finalement contenir 5 mg de sitagliptine totale par ml et être étiquetées comme '*Solution Essai du Stock de Sitagliptine*'. Ne préparer ces solutions que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec les liquides surnageants clairs ou troubles.

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

Les solutions essai du stock ne nécessitent pas de dilution supplémentaire. Elles constituent déjà la concentration de travail de 5 mg de sitagliptine par ml. Quand elle est préparée sur la base d'un produit de haute qualité, la solution essai doit égaler la concentration de sitagliptine de la solution témoin du travail supérieure produite ci-dessus. Pour faciliter la manipulation, une partie du liquide surnageant peut être transférée dans un flacon de 10 ml.

## 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 ou aux différentes concentrations et combinaisons de médicaments dans les solutions essai. 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.

Sécher délicatement les dépôts. Pour ce faire, tenir la plaque chromatographique avec la paire de pincettes dans le flux d'air chaud directement au-dessus de la plaque chauffante pendant environ 15 secondes. Secouer constamment la plaque CCM et chaque fois que la chromatoplaquette se déplace vers le bas, sa face inférieure peut toucher la surface de la plaque chauffante pendant quelques fractions de seconde.

## IX. DEVELOPPEMENT DU CHROMATOGRAMME

À l'aide des pipettes graduées appropriées, ajouter 11 ml d'acétate d'éthyle, 7 ml de méthanol, 1 ml de toluène et 1 ml de solution d'ammoniaque à 25% dans le récipient utilisé en tant que cuve chromatographique. Fermer la cuve et mélanger soigneusement. 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. Placer avec précaution la plaque CCM chargée dans la cuve et fermer avec le bouchon à vis. Laisser le front du solvant se déplacer sur une longueur correspondant aux trois-quarts de la plaque environ; la durée du développement étant d'environ 15 minutes. Retirer la plaque de la cuve, marquer le niveau atteint par le front du solvant au moyen d'un trait fin, puis faire sécher doucement tous les résidus de solvant. Pour ce faire, tenir la plaque chromatographique avec la paire de pincettes dans le flux d'air chaud directement au-dessus de la plaque chauffante pendant environ deux minutes. Secouer constamment la plaque CCM et chaque fois que la chromatoplaquette se déplace vers le bas, sa face inférieure peut toucher la surface de la plaque chauffante pendant quelques fractions de seconde.

## X. REVELATION DES TACHES

Après avoir séché tous les résidus de solvant, observer la plaque de chromatographie sous une lumière UV à 254 nm avec la lampe alimentée par batterie fournie. Pour une identification et une quantification plus poussées de sitagliptine, colorer la plaque chromatographique avec de l'iode dans la chambre à iode.

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

Une tache sombre à une distance de déplacement d'environ 0,68 indique la présence de sitagliptine dans la solution essai. En cas d'association avec le chlorhydrate de metformine, une large trace de metformine apparaît sous la sitagliptine avec une «valeur du rapport frontal» commençant à zéro et se terminant à environ 0,38. Les taches fortes supplémentaires

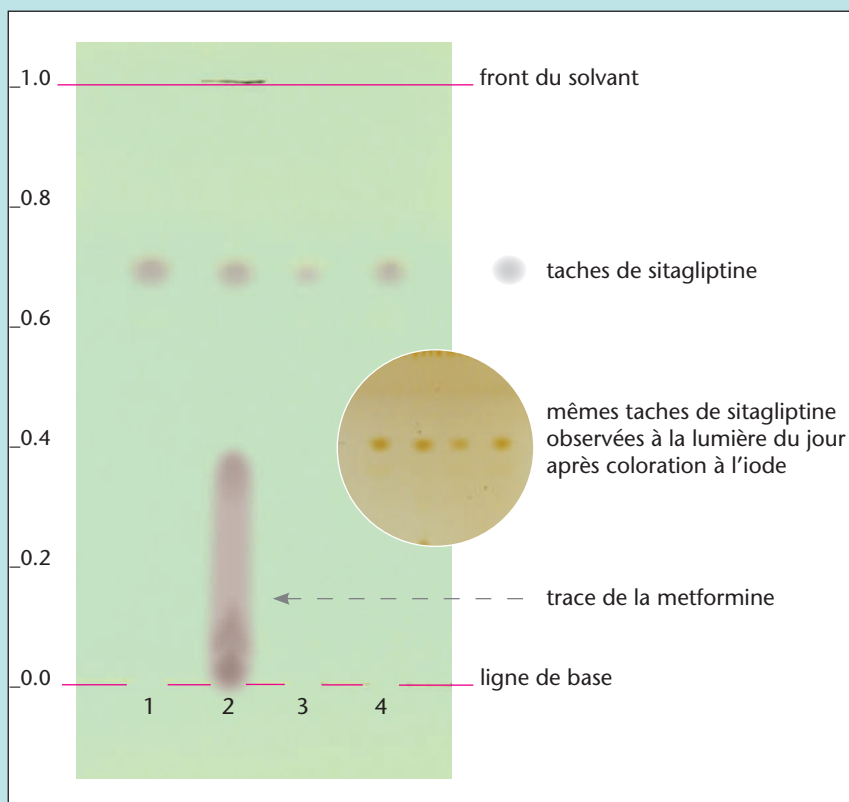
## CHROMATOGRAMME OBSERVE A LA LUMIERE UV DE 254 NM

Développement. n° 1:  
Solution témoin supérieure représentant 100% de sitagliptine totale

Développement. n° 2:  
Une association de metformine à dose fixe de bonne qualité avec une teneur acceptable en sitagliptine

Développement. n° 3:  
Un médicament monodosé de basse qualité à teneur faible inacceptable en sitagliptine

Développement. n° 4:  
Solution témoin inférieure représentant 80% de sitagliptine totale



généérées par la solution essai indiqueraient d'autres médicaments ou une dégradation de la sitagliptine, ce dernier cas étant plus probable lorsqu'il est associé à une tache principale plus petite. Une tache principale plus petite de la solution essai peut également indiquer une faible teneur en sitagliptine et s'il n'y a aucune tache, cela signifierait une absence totale de sitagliptine. Les agents auxiliaires incorporés dans différents produits finis peuvent provoquer des taches légères ou quasi inexistantes se déplaçant le long du front des solvants ou émergeant près ou sur la ligne de base.

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

Lors de l'exposition de la chromatoplaquette à la vapeur d'iode, toutes les taches de sitagliptine déjà observées à 254 nm deviennent brun-orange et deviennent visibles à la lumière du jour. Observer encore la plaque lorsque l'iode s'évapore. Les taches reflétant des produits de mauvaise qualité disparaissent d'abord progressivement, suivies par les taches de référence représentant une teneur en médicament de 80 et 100 pour cent, respectivement.

## XIII. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

La tache de sitagliptine du chromatogramme obtenue avec la solution essai doit correspondre en termes de couleur, de taille, d'intensité, de forme et de distance de déplacement 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. 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 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. A des fins de documentation, prendre des photos de tous les résultats avec un appareil photo numérique ou d'un smartphone avec le flash désactivé.

## Examen primaire du médicament via inspection physique

### I. INSPECTION PHYSIQUE

Lors de l'inspection visuelle, rechercher les anomalies d'étiquetage, d'emballage et de forme galénique comme décrit dans les premiers chapitres sur des méthodes et opérations générales du manuel principal, puis signaler les résultats. Prendre des photos, par exemple, avec un appareil photo ou un smartphone si possible. Chaque comprimé contient généralement 50 mg de vildagliptine par base libre. La vildagliptine peut être associée à la metformine en ajoutant 850 ou 1000 mg de sel de chlorhydrate de

metformine à la formulation du comprimé ou de la gélule. D'autres dosages sont connus pour exister. Vérifier le poids total des comprimés ou le poids de remplissage des gélules à l'aide de la balance de poche électronique fournie. Toutes les formulations de comprimés ou de gélules de sitagliptine à libération immédiate doivent également réussir le test de désintégration décrit au début du manuel principal. Ils doivent se désintégrer dans l'eau à 37 °C en moins de 30 minutes. Un échec d'un produit à libération immédiate représenterait une anomalie majeure.

### II. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

Les médicaments d'origine particulièrement bon marché, les produits pharmaceutiques dont les documents d'accompagnement sont incorrects ou manquants, dont la forme pharmaceutique ou l'emballage sont défectueux ou dont les étiquettes sont incomplètes, endommagées, manquantes ou rédigées dans une langue étrangère, ou encore les médicaments stockés dans de mauvaises conditions, doivent être soumis à un test de chromatographie sur couche mince.

## Vérification de l'identité et de la teneur en principe actif via le test de CCM

### I. PRINCIPE DU TEST

Associé ou non au chlorhydrate de metformine, la vildagliptine est extrait des comprimés ou des gélules avec un volume connu d'acétone et son identité et sa teneur sont ensuite vérifiées par chromatographie sur couche mince (CCM) par rapport à un agent de référence approprié. Cependant, certaines formulations posent des problèmes de matrice, notamment lorsqu'elles contiennent de l'hydroxypropylcellulose. Cette substance et d'autres polymères peuvent annuler l'essai. Pour un contrôle rapide de la qualité de la metformine, référer au protocole correspondant.

### II. EQUIPEMENT ET REACTIFS

- |  |   |
|--|---|
| 1) Pilon   | 14) Plaque chauffante   |
| 2) Feuille d'aluminium   | 15) Papier filtre   |
| 3) Entonnoir   | 16) Pair de ciseaux   |
| 4) Spatule   | 17) Pair de pincettes   |
| 5) Bande adhésive  | 18) Lampe UV de 254 nm  |
| 6) Stylo feutre  | 19) Lampe UV de 366 nm  |
| 7) Crayon et règle graduée   | 20) Cuve de révélation à l'iode   |
| 8) Fioles de verre de 10 ml  | 21) Acétone   |
| 9) Kit de pipettes graduées (1 to 25 ml)   | 22) Toluène   |
| 10) Kit de flacons de verre de laboratoire (25 to 100 ml)  | 23) Méthanol  |
| 11) Plaques d'aluminium CCM Merck pré-enduites au gel de silice 60 F <sub>254</sub> taille 5 x 10 cm | 24) Butan-1-ol  |
| 12) Tubes capillaire de verre de 2 µl de capacité  | 25) Acétate d'éthyle  |
| 13) Cuve chromatographique (récipient de 500 ml)   | 26) Solution d'ammoniaque 25%   |
|  | 27) Solution d'acide acétique 96%   |
|  | 28) Solution d'acide sulfurique 96%                                       |
|  | 29) Eau distillée/du robinet/embouteillée                                 |
|  | 30) Substance témoin, par exemple, des comprimés de vildagliptine à 50 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 à une seule dose contenant 50 mg de vildagliptine. 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 25 ml et faire écouler tous les résidus solides à l'aide de 5 ml d'acétone en utilisant une pipette graduée. Fermer le flacon de laboratoire et agiter pendant environ trois minutes jusqu'à ce que la plupart des solides soient dissous. Laisser reposer la solution pendant cinq autres minutes jusqu'à ce que les résidus non dissous se déposent au fond du flacon. La solution obtenue doit contenir 10 mg de vildagliptine totale par ml et être étiquetée comme 'Solution

*Témoin du Stock de Vildagliptine*'. Ne préparer cette solution que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec le liquide surnageant clair ou même trouble.

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

La solution témoin du stock ne nécessite aucune dilution supplémentaire. Elle représente déjà la concentration finale de travail de 10 mg de vildagliptine totale par ml. Pour une manipulation plus pratique, une partie du liquide surnageant peut être transférée dans un nouveau flacon de 10 ml.

Cette solution témoin constitue un médicament de bonne qualité contenant 100% de vildagliptine.

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

A l'aide des pipettes graduées, introduire 2 ml de la solution témoin du stock dans une fiole de 10 ml et ajouter 0,5 ml d'acétone. Fermer et agiter la fiole. La solution obtenue doit contenir 8 mg de vildagliptine totale par ml et être étiquetée comme *'Solution Témoin du Travail de Vildagliptine 80%'*.

Cette solution témoin représente un médicament de basse qualité contenant seulement 80% de la quantité de vildagliptine indiquée sur l'étiquette du produit. Dans la recherche présente, ce niveau de teneur en substance active constitue la limite la plus basse acceptable pour un produit pharmaceutique donné. Les limites des pharmacopées ne s'appliquent pas dans notre contexte.

#### VI. PREPARATION DE LA SOLUTION ESSAI DU STOCK D'UN MEDICAMENT DECLARANT UNE TENEUR EN VILDAGLIPTINE DE 50 MG PAR UNITE

Prendre un comprimé ou une gélule entière d'un médicament approprié échantillonné sur le terrain. Comme d'habitude, les comprimés sont enveloppés dans une feuille d'aluminium et réduits en fine poudre à l'aide d'un pilon. Introduire toute la poudre obtenue dans un flacon de laboratoire de 25 ml. La poudre obtenue à partir des gélules doit être placée directement dans un flacon ajoutant aussi les deux parties vides d'enveloppe de gélule à la fin. Pour l'extraction, ajouter 5 ml d'acétone en utilisant une pipette graduée appropriée. Fermer 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.

En association ou non avec le chlorhydrate de metformine, toutes les solutions essai du stock obtenues doivent finalement contenir 10 mg de vildagliptine totale par ml et être étiquetées comme *'Solution Essai du Stock de Vildagliptine'*. Ne préparer ces solutions que juste avant chaque test. Continuer à travailler avec les liquides surnageants clairs ou troubles.

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

Les solutions essai du stock ne nécessitent pas de dilution supplémentaire. Elles constituent déjà la concentration de travail de 10 mg de vildagliptine par ml. Quand elle est préparée sur la base d'un produit de haute qualité, la solution essai doit égaler la concentration de vildagliptine de la solution témoin du travail supérieure produite ci-dessus. Pour faciliter la manipulation, une partie du liquide surnageant peut être transférée dans un flacon de 10 ml.

#### 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 suivante, 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 ou aux différentes concentrations et combinaisons de médicaments dans les solutions essai. 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.

Sécher les taches. Pour ce faire, placer le chromatoplate sur la plaque chauffante pendant environ 15 secondes.

## IX. DEVELOPPEMENT DU CHROMATOGRAMME

Phase mobile «A» pour la quantification de la vildagliptine: À l'aide des pipettes graduées appropriées, ajouter 11 ml d'acétate d'éthyle, 7 ml de méthanol, 1 ml de toluène et 1 ml de solution d'ammoniaque à 25% dans le récipient utilisé en tant que cuve chromatographique. Fermer la cuve et mélanger soigneusement. 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. Placer avec précaution la plaque CCM chargée dans la cuve et fermer avec le bouchon à vis. Laisser le front du solvant se déplacer sur une longueur correspondant aux trois-quarts de la plaque environ; la durée du développement étant d'environ 15 minutes. Retirer la plaque de la cuve, marquer le niveau atteint par le front du solvant au moyen d'un trait fin, puis faire sécher doucement tous les résidus de solvant. Pour ce faire, tenir la plaque chromatographique avec la paire de pincettes dans le flux d'air chaud directement au-dessus de la plaque chauffante pendant environ deux minutes. Secouer constamment la plaque CCM et chaque fois que la chromatoplaquette se déplace vers le bas, sa face inférieure peut toucher la surface de la plaque chauffante pendant quelques fractions de seconde.

Phase mobile «B» pour la séparation de la vildagliptine, de la linagliptine et de la sitagliptine après leur extraction par le méthanol (VIL 10 mg/ml, LIN 1,25 mg/ml, SIT 5 mg/ml): Ajouter 12 ml de butan-1-ol, 3 ml de méthanol, 3 ml d'eau et 3 ml de solution d'acide acétique à 96 % dans la cuve chromatographique et mélanger. Attendre 15 minutes pour que la cuve soit saturée de vapeur de solvant. Placer ensuite la plaque CCM chargée dans la cuve, la fermer et développer la chromatoplate pendant environ 40 minutes. Retirer la plaque CCM de la cuve, marquer le front du solvant et sécher soigneusement la plaque dans un flux d'air chaud au-dessus de la plaque chauffante pendant environ deux minutes.

## X. REVELATION DES TACHES

Après avoir séché tous les résidus de solvant, observer la plaque de chromatographie sous une lumière UV à 254 nm avec la lampe alimentée par batterie fournie. Pour l'identification et la quantification initiales de la vildagliptine, colorer la plaque de chromatographie avec de l'iode dans la chambre à iode et l'examiner à la lumière du jour, puis sous lumière UV à 254 nm.

Colorer également la plaque d'iode avec de l'acide sulfurique dans la chaleur et observer la plaque obtenue sous lumière UV à 366 nm. Pour ce faire, remplir le béccher en plastique de 250 ml fourni avec 190 ml de méthanol, suivis de 10 ml de solution d'acide sulfurique à 96 %, et mélanger soigneusement. Laisser refroidir le mélange et immerger la plaque de chromatographie dans la solution de coloration en commençant par le fond, tout en s'assurant par une immersion profonde que la tache de vildagliptine située dans la partie supérieure de la plaque de chromatographie est capturée. Retirer immédiatement la plaque de la solution et laisser l'excès de liquide s'écouler sur une serviette en papier. Essuyer le liquide restant au dos de la plaque et sécher l'ensemble de la solution de coloration pendant environ 30 à 60 secondes à la température maximale sur la plaque chauffante fournie. Après avoir retiré la plaque chromatographique de la plaque chauffante, observer la plaque colorée à la lumière UV de 366 nm.

## XI. OBSERVATIONS A LA LUMIERE UV DE 254 NM AVANT LA COLORATION A L'IODE

Si la plaque CCM provient de la phase mobile «A», aucune tache ne doit être visible. La vildagliptine n'est pas détectable à 254 nm et lorsqu'elle est combinée au chlorhydrate de metformine, la metformine est éliminée du système en utilisant de l'acétone pour l'extraction, dans laquelle le chlorhydrate de metformine n'est pas soluble. Toute metformine résiduelle resterait à la ligne d'origine. Cependant, l'utilisation de la phase mobile «B» pour séparer les gliptines révèle une tache forte pour la linagliptine et une tache plus faible pour la sitagliptine.

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

Lorsque le chromatoplate de la phase mobile «A» est exposé à la vapeur d'iode, toutes les taches de vildagliptine deviennent brun jaunâtre et sont visibles à une distance d'environ 0,59. Les taches de vildagliptine provenant de formulations contenant de la silice fortement dispersée migrent très légèrement moins. Les taches fortes supplémentaires générées par la solution essai indiqueraient d'autres médicaments ou une dégradation de la vildagliptine, ce dernier cas étant plus probable lorsqu'il est associé à une tache principale plus petite. Une tache principale plus petite de la solution essai peut également indiquer une faible teneur en vildagliptine et s'il n'y a aucune tache, cela signifierait une absence totale de vildagliptine. Les agents auxiliaires incorporés dans différents produits finis peuvent provoquer des taches



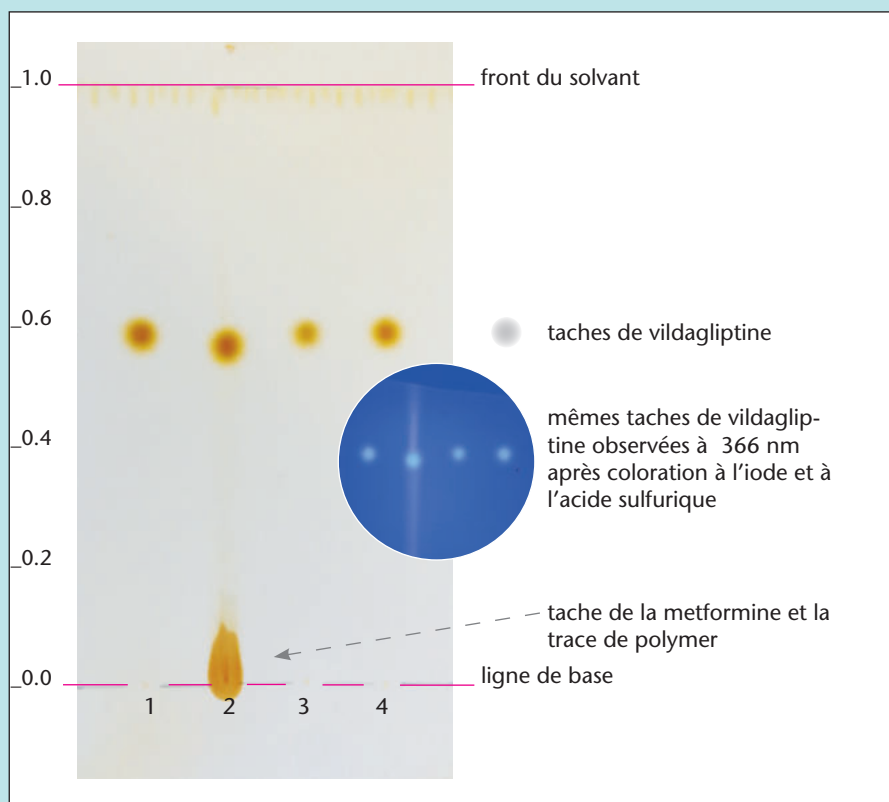
CHROMATOGRAMME DE LA PHASE MOBIL «A» OBSERVE A LA LUMIERE DU JOUR APRES COLORATION A L'IODE

Développement. n° 1:  
Solution témoin supérieure représentant 100% de vildagliptine totale

Développement. n° 2:  
Une association de metformine à dose fixe de bonne qualité avec une teneur acceptable en vildagliptine et un polymère de povidone et de la silice dans la matrice

Développement. n° 3:  
Un médicament monodosé de basse qualité à teneur faible inacceptable en vildagliptine

Développement. n° 4:  
Solution témoin inférieure représentant 80% de vildagliptine totale



légères ou quasi inexistantes se déplaçant le long du front des solvants ou émergeant près ou sur la ligne de base. Les polymères peuvent provoquer des traces complètes de l'origine à la ligne de front au lieu de taches. La vildagliptine est également visible sur la plaque TLC à partir de la séparation des gliptines, cette fois à côté de la linagliptine. La coloration de la sitagliptine est faible ou pas du tout prononcée.

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

Toutes les taches précédemment colorées à l'iode deviennent alors très sombres. Ceci s'applique également à la sitagliptine, de sorte que pour la première fois, les trois gliptines peuvent être observées simultanément sur la chromatoplate à partir de la phase mobile «B». La vildagliptine ayant une valeur du rapport frontal d'environ 0,37, la linagliptine d'environ 0,48 et la sitagliptine d'environ 0,58.

XIV. OBSERVATIONS A LA LUMIERE UV DE 366 NM APRES LA COLORATION A L'IODE ET L'ACIDE SULFURIQUE

Lors d'une coloration supplémentaire de la plaque d'iode avec de l'acide sulfurique et de la chaleur, toutes les taches de vildagliptine produisent une fluorescence blanche claire. La présence d'iode et de chaleur est importante. Lors du refroidissement, cette fluorescence disparaît mais peut éventuellement être réactivée en chauffant à nouveau la plaque CCM. Les essais fonctionnent mieux et l'interférence de la matrice peut être minimisée si le temps d'attente est prolongé pendant la préparation de l'échantillon pour permettre à la majorité des particules de silice très fines de couler au fond du récipient.

XV. RESULTATS ET MESURES A PRENDRE

La tache de vildagliptine du chromatogramme obtenue avec la solution essai doit correspondre en termes de couleur, de taille, d'intensité, de forme et de distance de déplacement 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. 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 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. A des fins de documentation, prendre des photos de tous les résultats avec un appareil photo numérique ou d'un smartphone avec le flash désactivé.

- Pour détecter les médicaments falsifiés et de qualité inférieure dans les pays à revenu faible ou intermédiaire
- Pour protéger les consommateurs et les chaînes d'approvisionnement en médicaments
- Pour augmenter les capacités d'analyse des médicaments prioritaires
- Pour aider à la surveillance de la qualité des médicaments après leur mise sur le marché
- Pour compléter le travail des laboratoires de contrôle des médicaments existants

#### Le GPHF-Minilab™

est un laboratoire miniature unique qui propose des méthodes d'essai abordables pour une détection rapide et facile des médicaments falsifiés et de qualité inférieure en tant que technologie d'entrée de gamme pour les établissements de soin de santé aux ressources limitées dans les pays à revenu faible ou intermédiaire.

En plus de vingt-cinq ans de travail sur de projet, le GPHF-Minilab™ a fait ses preuves dans plus de 100 pays.

Ce supplément au Manuel Minilab élargit la liste des médicaments antidiabétiques oraux à un total des sept ingrédients pharmaceutiques actifs, y compris leurs associations à dose fixe pour traiter les troubles diabétiques.

L'inventaire des méthodes du manuel GPHF-Minilab™ comprend désormais une collection de méthodes de test pour 119 principes actifs pour la vérification rapide de la qualité d'une large gamme de produits pharmaceutiques finis.



Global Pharma Health Fund  
[www.gphf.org](http://www.gphf.org)