

## LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Réactions de formation du para-aminophénol et de la quinone à partir du paracétamol.....	12
Figure 2 : Structures chimiques de la benzylpénicilline (en forme L) .....	13
Figure 3 : Représentation des énantiomères du glycéraldéhyde selon la convention de Fisher et selon la règle des séquences.....	22
Figure 4 : Structures de la phénytoïne et son impureté principale.....	29
Figure 5 : Schéma de l'appareillage d'un spectromètre ICP-AES.....	30
Figure 6 : Diagramme schématique d'un ICP-MS.....	32
Figure 7 : Structures de la ciprofloxacine et de ses impuretés connues.....	38
Figure 8 : Schéma d'une chaîne CLHP.....	40
Figure 9 : Formation des diastéréoisomères par l'approche indirecte (dérivation) .....	41
Figure 10 : Moxifloxacine et ses impuretés identifiées par HPLC-UV/FTICRMS.....	43
Figure 11 : Schéma général d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme.....	45
Figure 12 : Structures du propan-2-ol, du toluène et du méthanol.....	46
Figure 13: Chromatogrammes de la solution médicamenteuse, dopée à 0,1% (v/v), 0,3% (v/v) .....	48
Figure 14 : Structures de la ceftazidime et ses impuretés potentielles.....	49
Figure 15 : Chromatogrammes d'un échantillon d'irbesartan dopé avec 5, 10, 20, 40, 60 et 80 µg.l-1 azoture.....	51
Figure 16 : Structures de la céf épime et du N-méthylpyrrolidine.....	55
Figure 17 : Polarogramme d'un échantillon d'eau dopé par un ajout de métaux.....	59

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Conditions d'étude de stabilité en temps réel : valeurs mesurées à l'air libre et en entrepôt.....	11
Tableau II : Effets soupçonnés ou prouvés de métaux sur la santé humaine....	18
Tableau III : Données d'exactitude et de fidélité des trois méthodes lors de la détermination de la Benzophénone.....	28
Tableau IV : Comparaison de limites de détection entre ICP-MS et ICP-AES.....	35
Tableau V : Données de reproductibilité de la méthode pour le toluène.....	46
Tableau VI : Données d'exactitude de la méthode pour le propan-2-ol et le méthanol.....	47
Tableau VII : Données de LD, LQ et du coefficient de corrélation ( $r^2$ ) des différentes impuretés.....	49
Tableau VIII : Précision et Rendement de l'azoture.....	50
Tableau IX : Quelques applications de la CI.....	52

## SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR LES FORMES PHARMACEUTIQUES.....	3
1. FORMES PHARMACEUTIQUES.....	4
1.1. FORMES ORALES.....	4
1.1.1. Comprimés.....	4
1.1.2. Sirops.....	4
1.1.3. Gélules.....	5
1.2. FORMES INJECTABLES.....	6
1.3. SUPPOSITOIRES.....	7
1.4. FORMES PHARMACEUTIQUES APPLIQUEES SUR LA PEAU.....	7
1.4.1. Pommades.....	7
1.4.2. Pâtes.....	8
1.4.3. Crèmes.....	8
1.4.4. Gels.....	8
2. IMPURETES PHARMACEUTIQUES.....	9
2.1. Définition.....	9
2.2. Origine et nature des impuretés.....	9
2.2.1. IMPURETES ORGANIQUES : PRODUITS DE DEGRADATION.....	10
2.2.1.1. Nature et problématique de la stabilité des médicaments.....	10
2.2.1.2. Origines.....	12
2.2.1.2.1. Réaction d'hydrolyse.....	12
2.2.1.2.2. Réaction de photodégradation.....	13
2.2.1.2.3. Réaction d'oxydoréduction.....	14
2.2.1.3. Toxicité des produits de dégradation.....	15
2.2.2. IMPURETES INORGANIQUES : LES METAUX LOURDS.....	16
2.2.2.1. Nature.....	16
2.2.2.2. Origines des métaux lourds dans les produits pharmaceutiques.....	16

2.2.2.3. Impact sur l'homme.....	16
2.2.3. SOLVANTS RESIDUELS.....	19
2.2.3.1. Nature.....	19
2.2.3.2. Origines.....	19
2.2.3.3. Classification.....	19
2.2.3.4. Conséquences sur l'homme.....	20
2.2.3.5. Interactions solvents résiduels et molécule (s) active (s) .....	21
2.2.4. IMPURETES STEREOCHIMIQUES.....	21
2.3. Aspects réglementaires des impuretés.....	23
<b>DEUXIEME PARTIE : METHODES DE DOSAGE DES IMPURETES DANS LES FORMES PHARMACEUTIQUES.....</b>	<b>25</b>
1. OBJECTIF DE L'ETUDE.....	26
2. METHODES DE DOSAGE DES IMPURETES DANS LES FORMES PHARMACEUTIQUES.....	26
2.1. METHODES SPECTRALES.....	26
2.1.1. Spectrophotométrie (UV-VISIBLE) .....	26
2.1.1.1. Principe.....	26
2.1.1.2. Appareillage.....	27
2.1.1.3. Application à la recherche et au dosage des impuretés : dosage de la benzophénone.....	27
2.1.2. Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES) .....	29
2.1.2.1. Principe.....	29
2.1.2.2. Appareillage.....	29
2.1.2.3. Application d'ICP-AES : Développement et validation d'une ICP- AES en vue d'une monographie dans la pharmacopée américaine.....	30
2.1.3. Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS)...	31
2.1.3.1. Principe.....	31
2.1.3.2. Appareillage.....	32
2.1.3.3. Application d'ICP-MS.....	32

2.1.4. Comparaison de quelques méthodes spectrales.....	33
2.1.4.1. Comparaison entre SAA, ICP-AES et ICP-MS.....	33
2.1.4.2. Comparaison entre ICP-MS et ICP-AES : Exemple de dosage des métaux dans les comprimés d'Amphétamine.....	33
2.1.5. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	36
2.1.5.1. Appareillage.....	36
2.1.5.2. Application de la RMN à la recherche et au dosage d'impuretés.....	36
2.2. METHODES SEPARATIVES.....	39
2.2.1. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES.....	39
2.2.1.1. Principe général.....	39
2.2.1.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) .....	39
2.2.1.2.1. Appareillage.....	39
2.2.1.2.2. Applications de la CLHP : Détermination d'impuretés stéréochimiques.....	41
2.2.1.3. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) .....	44
2.2.1.3.1. Appareillage.....	44
2.2.1.3.2. Applications de la CPG au dosage des impuretés.....	45
2.2.1.4. Chromatographie ionique (CI) .....	50
2.2.2. Electrophorèse Capillaire (EC) .....	53
2.2.2.1. Principe.....	53
2.2.2.2. Appareillage.....	54
2.2.2.3. Applications de l'EC pour la recherche et le dosage des impuretés.....	54
2.3. ELECTROCHIMIE : LA POLAROGRAPHIE.....	56
2.3.1. Polarographie impulsionale différentielle (DPP) .....	57
2.3.1.1. Principe.....	57
2.3.1.2. Application de la DPP pour le dosage de la benzophénone dans les capsules et les suspensions de phénytoïne.....	57
2.3.2. Polarographie à redissolution anodique.....	58
2.3.2.1. Principe.....	58

2.3.2.2. Application de la polarographie à redissolution anodique.....	59
3. DISCUSSION.....	60
CONCLUSION.....	64
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	67
ANNEXES .....	81

## INTRODUCTION

Les progrès de l'industrie pharmaceutique ont permis la présentation des médicaments sous différentes formes pharmaceutiques (comprimés, solutions injectables, solutions buvables, suppositoires, solutions oculaires etc.). Ces formes pharmaceutiques proviennent de différents procédés de fabrication qui sont souvent à l'origine de l'apparition d'impuretés à côté du ou des principes actifs et/ou des excipients. Certaines impuretés (produits de dégradation) font leur apparition lorsque les conditions de conservation du produit médicamenteux sont défavorables [32].

Les impuretés constituent un danger réel pour la santé des populations. Elles sont responsables de nombreuses pathologies. Les produits de dégradation conduisent à de graves altérations du matériel génétique pouvant être à l'origine de cancers [25]. Les métaux lourds ont tendance à perturber le système reproducteur et endocrinien. Grâce à leur capacité à traverser les barrières encéphalique et placentaire, ils sont souvent responsables de nombreux troubles neurologiques et de malformations chez le fœtus [45].

Les solvants résiduels sont aussi capables de traverser les barrières membranaires en raison leur liposolubilité et d'exercer une action tératogène. Ils peuvent conduire à un refus du produit en lui conférant une odeur désagréable [30].

Cela rend nécessaire de réglementer ces substances dans les produits pharmaceutiques. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail dont l'objectif est de contribuer à la mise en place de produits de bonne qualité.

Ce travail comporte deux parties :

- La première partie traite les généralités sur les formes pharmaceutiques et les différents types d'impuretés ;
- La deuxième partie décrit les méthodes de dosage des impuretés dans les formes pharmaceutiques.

## **PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR LES FORMES PHARMACEUTIQUES ET LES DIFFERENTS TYPES D'IMPURETES**

## **1. FORMES PHARMACEUTIQUES**

### **1.1. FORMES ORALES**

#### **1.1.1. Comprimés**

"Les comprimés sont des préparations de consistance solide obtenues par agglomération d'une ou de plusieurs substances médicamenteuses additionnées ou non d'adjuvants" [51].

Hormis les sirops, les comprimés restent les formes les plus utilisées en thérapeutique. Cette commodité est du fait qu'ils présentent certains avantages :

- emploi facile : les comprimés sont d'un volume réduit et leur solidité leur permet une résistance aux chocs ;
- présentation à dosage précis par unité de prise ce qui permet d'éviter les phénomènes de sur ou sous dosage ;
- facilité de conservation ;
- fabrication industrielle à grande échelle d'où un prix de revient peu élevé ;
- forme pharmaceutique intéressante pour les principes actifs peu solubles ;
- masquage de la saveur désagréable de certains principes actifs par l'enrobage [40].

En plus de ses avantages, ils ont des inconvénients qui pourraient affecter l'effet thérapeutique du principe actif. Il s'agit :

- l'odeur désagréable du ou des principe(s) actif(s) (P.A.) ;
- l'action corrosive des P.A. au niveau des voies digestives [18 ; 40] ;
- destruction des P.A. par les sucs digestifs.

#### **1.1.2. Sirops**

"Les sirops sont des préparations aqueuses contenant une forte proportion de sucre ce qui leur donne leur consistance et assure leur conservation sous certaines conditions" [52].

Le sucre utilisé est le saccharose, sa présence en quantité suffisante permet de masquer la saveur désagréable des principes actifs et d'assurer la conservation.

Les sirops sont des formes pharmaceutiques à caractéristiques avantageuses. L'emploi est facile pour les enfants et les adultes qui ne parviennent pas à avaler les comprimés.

En plus la saveur désagréable des principes actifs est masquée par le sucre et il y'a une possibilité d'ajouts de substances conservatrices.

Cependant les sirops présentent certains inconvénients qui peuvent entraîner :

- une modification du pH entraînant des phénomènes de cristallisation ;
- une instabilité des principes actifs en milieux aqueux.

En quantité importante, le sucre se cristallise conduisant à des altérations. Dans ce cas il faut ajouter une quantité d'eau nécessaire pour rajuster la densité.

En quantité faible, le sirop sera très dilué et favorise la prolifération des micro-organismes, des levures et des moisissures. Pour contrecarrer ce phénomène si le principe actif supporte la chaleur, il faut chauffer pour le ramener à pH voulu [18 ; 52].

### **1.1.3. Gélules**

Les gélules sont des cupules ovoïdes creuses à base de gélatine.

Elles sont composées de deux cupules qui s'emboitent l'une dans l'autre.

L'enveloppe est le plus souvent à base de gélatine ou d'autres substances de consistance adaptée, par exemple le glycérol ou le sorbitol.

Elles présentent des avantages suivants :

- administration des produits instables sous forme comprimé ;
- formule facile à fabriquer ;
- fabrication peut être faite aussi bien à l'industrie qu'à l'officine ;
- nombre d'adjuvants plus réduit ce qui facilite les contrôles [52].

## 1.2. FORMES INJECTABLES

"Les préparations pour usage parentéral sont des produits stériles à être injectés ou implantés dans le corps humain ou animal.

Ces médicaments se présentent sous trois formes pharmaceutiques : préparations injectables, préparations injectables pour perfusion et poudres pour préparations injectables.

Les préparations injectables sont des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles. Elles sont préparées en dissolvant, en émulsionnant ou en dispersant les principes actifs et les adjuvants éventuels dans l'eau pour préparation injectable (EPPI), dans un liquide non aqueux approprié ou dans un mélange de deux liquides, s'ils sont miscibles l'un de l'autre.

Les préparations injectables pour perfusion sont des solutions aqueuses ou des émulsions à phase externe aqueuse, exemptes de pyrogènes, stériles et dans la mesure du possible rendus isotoniques au sang.

Les poudres pour préparations injectables sont des substances solides, stériles, réparties dans les récipients définitifs ; elles donnent rapidement après agitation, une solution avec un volume prescrit du liquide stérile approprié, une solution pratiquement limpide et pratiquement exempte de particules ou une suspension uniforme." [40]

Ces préparations injectables ont des avantages et des inconvénients.

- Avantages
  - ✓ rapidité d'action ;
  - ✓ pas de destruction du principe actif par les sucs digestifs.
- Inconvénients
  - ✓ risque de souillures par des germes responsables d'infection
  - ✓ effet douloureux lors de l'injection ;
  - ✓ nécessité d'un personnel compétent ;
  - ✓ obligation d'un matériel approprié [52].

### 1.3. SUPPOSITOIRES

Les suppositoires sont des préparations de consistance molle ou solide, auxquelles on donne, en les coulant ou en les comprimant dans des moules appropriés, une forme qui facilite leur introduction dans le rectum [51].

- Avantages des suppositoires
  - ✓ diffusion rapide et action rapide, surtout chez l'enfant ou cette voie est réputée aussi rapide qu'une voie intraveineuse [52] ;
  - ✓ pas de détection de goût et de saveur désagréable ;
  - ✓ conservation à milieu ambiant.
- Inconvénients des suppositoires
  - ✓ irritation de la muqueuse rectale pour les principes actifs agressifs,
  - ✓ forme souvent non désirée ;
  - ✓ absorption incomplète de P.A : il subsiste la possibilité d'un effet de premier passage hépatique [18 ; 52].

### 1.4. FORMES PHARMACEUTIQUES APPLIQUEES SUR LA PEAU

Selon la pharmacopée européenne 6.0, ce sont des préparations semi-solides pour application cutanée, destinées à être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou transdermique de P.A.

Elles sont présentées sous différentes formulations [51].

#### 1.4.1. Pommades

Ce sont des préparations composées d'un excipient monophasé dans lequel peuvent être dissoutes ou dispersées des substances solides ou liquides.

Selon la nature de l'excipient, il existe :

- des pommades hydrophiles ;
- des pommades hydrophobes c'est-à-dire lipophiles ;
- des pommades absorbant de l'eau.

#### **1.4.2. Pâtes**

Ce sont des préparations semi-solides contenant de fortes proportions de poudre (supérieures à 50%) finement dispersées dans l'excipient.

#### **1.4.3. Crèmes**

Appelées souvent émulsions épaisses sont des préparations multiphasiques.

#### **1.4.4. Gels**

Ce sont des préparations constituées par des liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés.

L'application des médicaments via la peau permet d'obtenir :

- une action locale, superficielle : (cas des anesthésiques locaux) ;
- une action profonde en cas d'inflammation ;
- une action systémique surtout avec l'utilisation des anti-angoreux.

L'inconvénient résulte surtout du fait de la difficulté de traversée des principes actifs à la barrière cutanée. Il faut une bonne connaissance à la fois des excipients et des principes actifs pour rendre efficace le médicament [18].

## 2. IMPURETÉS PHARMACEUTIQUES

### 2.1. Définition

La conférence internationale de l'harmonisation (ICH) définit l'impureté comme « tout constituant du produit qui n'est pas la substance médicamenteuse ou un excipient dans le produit fini » [31].

Cette définition peut aider à produire une définition plus concise d'une impureté : elle est n'importe quelle matière qui affecte la pureté de la matière d'intérêt, un ingrédient pharmaceutique actif ou une substance médicamenteuse.

### 2.2. Origine et nature des impuretés

La sécurité et la qualité d'un médicament peuvent être impactées par la présence d'impuretés. La nature et la quantité de ces impuretés sont dirigées par certains facteurs :

- le parcours synthétique de la substance médicamenteuse ;
- les conditions de réaction ;
- la qualité de la matière de base du principe actif ;
- les réactifs et les solvants utilisés lors de la synthèse ;
- les étapes de purification ;
- les procédés de fabrication du produit médicamenteux ;
- l'emballage et le stockage du produit médicamenteux [31].

Selon l'ICH, les impuretés dans les formes pharmaceutiques peuvent être classées dans les catégories suivantes :

- impuretés organiques (liées au procédé de fabrication et au médicament) ;
- impuretés inorganiques (liées aux procédés de fabrication et de synthèse) ;
- solvants résiduels [30].

Les impuretés organiques peuvent apparaître durant la fabrication et/ou l'entreposage de la nouvelle substance médicamenteuse. Elles peuvent être connues ou non, volatiles ou non et elles comprennent :

- les produits de base ;

- les sous-produits ;
- les intermédiaires (substances produites en cours de synthèse) ;
- les produits de dégradation ;
- les réactifs, les ligands et les catalyseurs.

Les impuretés inorganiques peuvent provenir du procédé de fabrication.

Généralement, elles sont connues et identifiées et comprennent :

- les réactifs, les ligands et les catalyseurs ;
- les métaux lourds et autres métaux résiduels ;
- les sels inorganiques ;
- autres substances (les adjuvants de filtration) [6].

Les solvants sont des liquides organiques ou inorganiques utilisés comme véhicule dans la préparation de solutions ou de suspensions dans la synthèse d'une nouvelle substance pharmaceutique [30].

A côté de ces trois groupes d'impuretés, il existe les impuretés stéréochimiques. Ce sont des impuretés qui ont la même formule moléculaire et la même connexion entre divers atomes que la molécule d'intérêt. La différence se situe seulement dans l'arrangement des atomes dans l'espace tridimensionnel.

## **2.2.1. IMPURETES ORGANIQUES : PRODUITS DE DEGRADATION**

### **2.2.1.1. Nature et problématique de la stabilité des médicaments**

Les produits de dégradation sont définis selon l' ICH comme des impuretés résultant d'une modification chimique de la substance médicamenteuse qui se produit au cours de la fabrication ou durant l'entreposage d'un nouveau produit par suite de l'action , par exemple de la lumière, de la température, du pH, de l'humidité ou une réaction avec un excipient et/ou le système récipient-fermeture [31].

Le principe actif (P.A) contenu dans une forme pharmaceutique doit être soumis à des conditions favorables afin d'éviter sa dégradation. Donc, il est très important de conduire des études de stabilité pour évaluer la stabilité du produit.

En effet, "un médicament est considéré comme stable lors que, dans un laps de temps déterminé, ses propriétés essentielles ne changent pas ou le font dans des proportions tolérables" [2] ; de plus, il est attendu que le médicament doit être conservé dans des conditions appropriées et prescrites de température, d'humidité et d'exposition à la lumière et qu'un récipient convenable doit être utilisé.

Pour pouvoir commercialiser un produit, le fabricant doit s'assurer que ce dernier s'adapte bien aux conditions climatiques du pays destinataire.

Il existe deux types d'études de stabilité [32] :

- les études de dégradation accélérées, en soumettant le médicament à des conditions de stockage extrêmes dans le cas du programme officiel des études de stabilité ( $40^{\circ}\text{C}\pm2^{\circ}\text{C}$  ;  $75\%$  HR $\pm5\%$  ; minimum six mois) ;
- les études de stabilité en temps réel : étude expérimentale des caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et microbiologiques d'un médicament pendant sa durée de validité et d'utilisation prévue et au delà, dans des conditions de stockage prévues pour le marché auquel il est destiné ( $30^{\circ}\text{C}\pm2^{\circ}\text{C}$  ;  $65\%\pm2^{\circ}\text{C}$  ; minimum douze mois).

L'OMS a défini quatre zones climatiques selon leur condition de température et d'hygrométrie [51].

Zones climatiques	Mesures à l'air libre*		Mesures en entrepôt*	
	Température °C	Humidité relative %	Température °C	Humidité relative %
I	10,9	75	18,7	45
II	17,0	70	21,1	52
III	24,4	39	26,0	54
IV	26,5	77	28,0	70

Tableau I : Conditions d'étude de stabilité en temps réel : valeurs mesurées à l'air libre et en entrepôt [51].

Zone I : climat tempéré ; Zone II : climat subtropical avec possibilité de forte humidité ; Zone III : climat chaud et sec ; Zone IV : climat chaud et humide

La lumière, l'humidité et la température sont les principaux facteurs favorisant la dégradation des principes actifs.

### 2.2.1.2. Origines

Les produits de dégradation sont issus d'une série de réactions telles que l'hydrolyse, la photodégradation et les réactions d'oxydoréduction.

#### 2.2.1.2.1. Réaction d'hydrolyse

C'est une réaction qui implique l'addition d'une molécule d'eau sur un groupement fonctionnel et qui en provoque la rupture résultant en la formation de deux autres molécules ou à l'ouverture d'un cycle (voir pénicillines). La réaction est provoquée par les ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  (ion hydronium) ou  $\text{OH}^-$  (ion hydroxyle) de l'eau dépendamment du pH de la solution. L'eau responsable de cette réaction peut provenir de son utilisation pendant la granulation. Il ne faut pas oublier de noter que l'eau est source de nombreuses impuretés (catalyseurs métalliques). Ainsi, les molécules sensibles à l'action de l'eau conduisent à la formation de produits intermédiaires. C'est le cas du paracétamol qui en milieu humide donne le para-aminophénol. Ce dernier aboutit aussi à la formation d'autres produits de dégradation tels que la quinone [19].

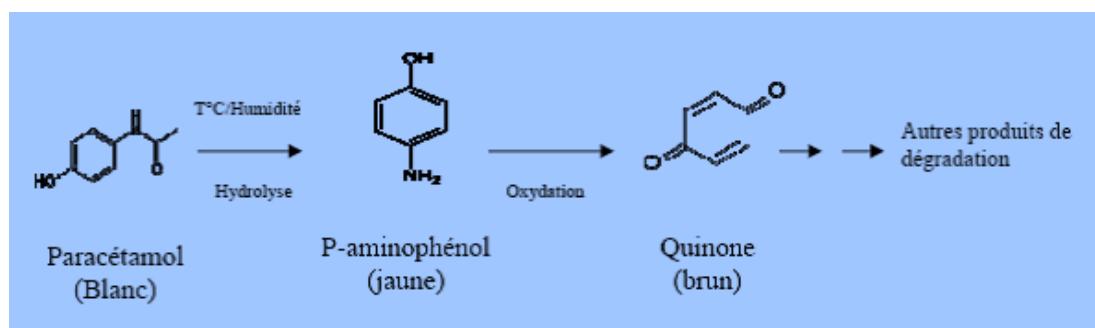


Figure 1 : Réactions de formation du para-aminophénol et de la quinone à partir du paracétamol [19].

D'après PIOT(1997), une épimérisation de la tétracycline en anhydro-épitétracycline est possible. Ce dernier est responsable des lésions tubulaires de type Toni-Debré-Fanconi sous l'effet de la chaleur et de l'humidité [53].

Les pénicillines sont des composés hétérocycliques substitués. La figure 2 ci-dessous donne l'exemple de la structure chimique de la benzylpénicilline.

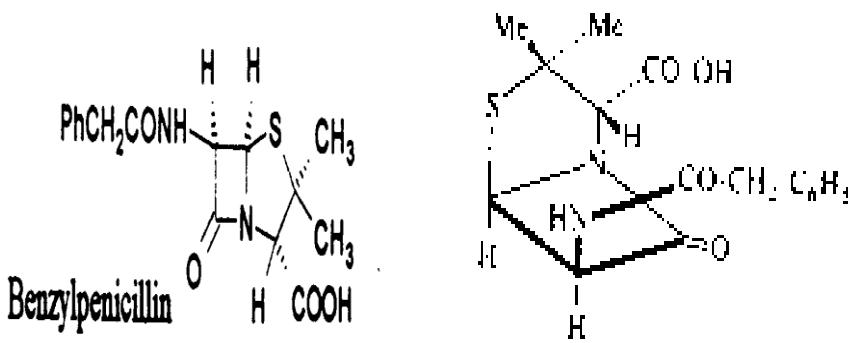


Figure 2 : Structures chimiques de la benzylpénicilline (en forme L) [9].

Les pénicillines peuvent être dégradées chimiquement en milieu acide ou basique. La vitesse de la dégradation dépend du pH de la solution. Le produit primaire de dégradation résulte de l'ouverture du cycle bêta-lactame qui est préférentiellement hydrolysé en raison de la plus grande tension des liaisons chimiques du cycle. L'hydrolyse entraîne une perte de l'activité bactéricide puisque le cycle bêta-lactame est responsable de l'activité antibiotique [9].

Pour s'opposer à cette dégradation les chimistes ont envisagé l'addition de substituants attracteurs d'électrons sur le carbone (voisin) du groupement carbonyle de la chaîne latérale.

### 2.2.1.2.2. Réaction de photodégradation

Lors d'une exposition à la lumière du soleil, une décomposition des médicaments peut survenir. La vitesse de dégradation dépend de la concentration en principe actif, de l'intensité de la lumière et de la durée d'exposition. L'action de la lumière peut accélérer des réactions de photodégradation notamment à l'origine d'oxydation et/ou d'hydrolyse dues à la

formation de radicaux libres, en particulier en présence de rayonnement à courte longueur d'onde (rayonnement UV) [17].

Cette photodégradation conduit à une diminution de l'efficacité du produit actif et/ou une formation de produits secondaires.

Il a ainsi été démontré que les vitamines diluées dans une nutrition parentérale sont stables pendant 24h, sauf la vitamine C qui subit une photodégradation d'environ 20-30% et la vitamine B1 de 10-20% [39]. D'autre part, la photodégradation des lipides et des vitamines conduit à la formation de peroxydes, de radicaux libres potentiellement toxiques notamment pour le prématuré. La réaction est d'autant plus importante que l'intensité de la lumière est forte, ce qui est le cas par exemple lors de la photothérapie (lumière UV) [20].

#### 2.2.1.2.3. Réaction d'oxydoréduction [9]

Une réaction d'oxydoréduction, ou réaction redox, implique un transfert d'électrons d'une espèce chimique à une autre.

Par définition :

- un agent oxydant est une espèce chimique qui accepte des électrons ;
- un agent réducteur, une espèce chimique qui cède des électrons.

La détérioration d'une drogue par oxydation nécessite la présence d'oxygène et se fait selon trois étapes : initiation, propagation et terminaison.

##### Initiation

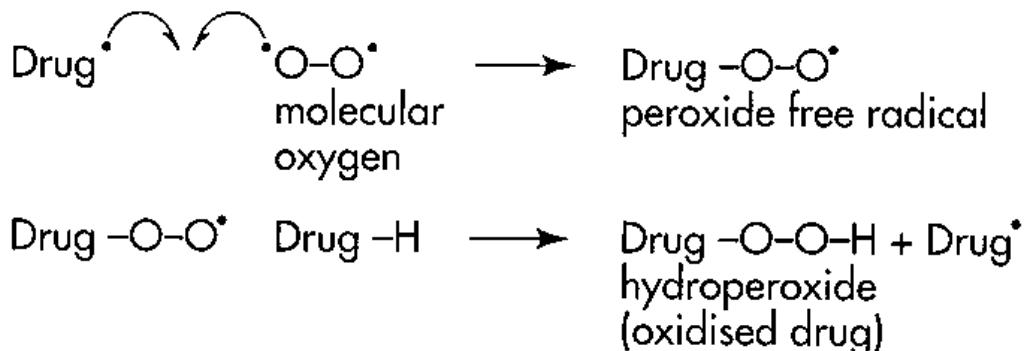
La première étape de la séquence réactionnelle implique la formation de radicaux par rupture homolytique d'une liaison.



La liaison se rompt de manière à ce que les deux électrons qui y sont impliqués se partagent symétriquement entre les deux atomes (ou fragments) concernés.

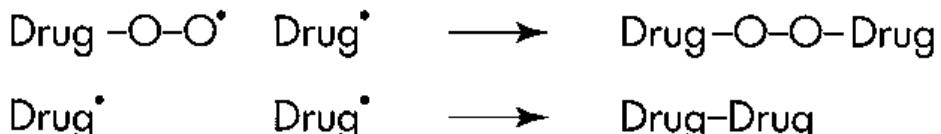
## Propagation

Dans la deuxième étape, les radicaux libres réagissent ensemble pour produire de plus en plus d'espèces réactionnelles (peroxydes et hydroperoxydes).



## Terminaison

La fin de la réaction est marquée par la formation de liaisons covalentes entre les radicaux et les atomes libres.



### 2.2.1.3. Toxicité des produits de dégradation

La dégradation des substances actives conduit à la formation de radicaux libres.

On appelle radical libre toute molécule qui contient un ou plusieurs électrons libres (célibataires) la rendant très réactive. Ces produits secondaires sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO) du fait de leur instabilité.

Les ERO en particulier les radicaux hydroxyles ont la facilité de léser et de modifier les bases puriques et pyrimidiques [25]. Quand les mécanismes de protection de l'organisme sont insuffisants, de graves altérations du matériel génétique sont induites, comme des mutations pouvant être à l'origine de cancers [41].

## **2.2.2. IMPURETÉS INORGANIQUES : LES METAUX LOURDS**

### **2.2.2.1. Nature**

Les métaux lourds ont de multiples définitions qui dépendent du contexte et de l'objet de l'étude. Dans ce contexte, les définitions retenues sont :

Les métaux lourds sont définis comme :

- Tout métal ayant une densité supérieure à 5 ;
- Tout métal ayant un numéro atomique élevé, en général supérieur à celui du sodium ( $Z=11$ ) ;
- Tout métal pouvant être toxique pour les systèmes biologiques [5].

### **2.2.2.2. Origines des métaux lourds dans les produits pharmaceutiques**

Les métaux lourds entrent dans la famille des impuretés inorganiques. Ils proviennent généralement de sources diverses à savoir les matières premières, les réactifs, les solvants, les catalyseurs, les milieux réactionnels, la plomberie et d'autres équipements (électrodes, thermomètres etc.) utilisés pendant la synthèse de produits pharmaceutiques [56].

Le palladium et ses composés sont les impuretés potentielles de plusieurs médicaments et font souvent l'objet d'un contrôle en routine [74]. La détermination de tungstène résiduel dans les intermédiaires de processus de fabrication et dans les médicaments est très fréquente puisque le tungstène composant des catalyseurs est utilisé dans la synthèse de plusieurs produits pharmaceutiques [63].

Certains métaux comme le fer peuvent apparaître lors de la fabrication et du conditionnement du médicament.

### **2.2.2.3. Impact sur l'homme**

Les métaux lourds sont responsables de nombreuses pathologies parmi lesquelles, les maladies cardiovasculaires, telles que l'artériosclérose ou la thrombose [45]. Il a été prouvé que les métaux lourds peuvent contribuer à des

pathologies immunologiques telles que la sclérose en plaque ou d'autres défaillances immunitaires (inflammations chroniques, allergies etc.). Ils ont aussi tendance à perturber le système reproducteur et endocrinien. Des effets neurotoxiques peuvent survenir quand ces métaux franchissent la barrière encéphalique créant ainsi un désordre au niveau du système nerveux central et chez le fœtus, un dérèglement du développement cérébral.

Le saturnisme est l'intoxication aigüe ou chronique par le plomb. Il affecte surtout les enfants et provoque chez ces derniers des retards irréversibles [36].

Le tableau suivant montre les effets soupçonnés ou prouvés de métaux sur la santé humaine.

Tableau II : Effets soupçonnés ou prouvés de métaux sur la santé humaine [46].

Métal	Maladies organiques	Maladies neurologiques et psychiatriques
Aluminium	Douleurs articulaires, décalcification des os, anémie ;	Démence, Alzheimer, Parkinson, Encéphalopathie avec des perturbations de mémoire, de concentration et de mobilité ;
Cadmium	Lésions rénales et pulmonaires, fragilisation des os, anémies, augmentation du risque de cancer en cas d'inhalation ;	-
Arsenic	Diabète de type 2 ;	Atteintes au système nerveux, menant à des faiblesses, surdité, paresthésies, psychoses organiques avec somnolence, troubles, stupeur, délires, schizophrénie ;
Plomb	Effets hématologiques et cardiovasculaires (hypertension), atteintes rénales ;	Dépressions allant jusqu'au suicide, manque d'attention, atteinte à l'intelligence visuelle et aux fonctions motrices, troubles de mémoire, difficultés d'apprentissage, états de fatigue, agitation, agressivité, psychoses, hallucinations, polyneuropathie périphérique, encéphalopathie, saturnisme ;
Mercure	Lésions du cerveau, maladies auto-immunes (arthrite rhumatismal, lupus, sclérose en plaques), maladies cardiovasculaires (hypertension et autres), cancer du foie ;	Diminution de l'intelligence, troubles de la parole, agitation, agressivité, troubles visuels et auditifs, polyneuropathie, myasthénie grave, Alzheimer ;
Nickel	Allergies, dermatites, eczémas ;	Maux de tête, vertiges, manque de sommeil.

## **2.2.3. SOLVANTS RESIDUELS**

### **2.2.3.1. Nature**

Les solvants résiduels présents dans les produits pharmaceutiques sont considérés comme étant des substances chimiques organiques volatiles utilisées ou produites dans le cadre de la fabrication de substances médicamenteuses ou d'excipients ou lors de la fabrication des produits finis [30].

### **2.2.3.2. Origines**

Les solvants résiduels proviennent de leurs précurseurs utilisés pour la synthèse d'une molécule pharmaceutique dans le but d'améliorer le rendement ou de produire les caractéristiques comme la forme cristalline, la pureté et la solubilité. Ils résultent aussi de leur utilisation pour l'extraction des principes actifs.

Après utilisation, ils doivent être éliminés par évaporation. Malheureusement, les techniques d'évaporation conçues ne les éliminent pas complètement.

Ces solvants peuvent aussi réagir avec certains produits chimiques utilisés lors de la synthèse pour générer d'autres impuretés [30].

### **2.2.3.3. Classification**

La classification est effectuée en fonction du risque déterminé par l'exposition journalière admissible (EJA) [30].

Le terme « apport quotidien tolérable » (AQT) est utilisé par le programme international sur la sécurité des substances chimiques (PISC) pour décrire les limites d'exposition à des produits chimiques toxiques, alors que le terme « dose journalière admissible » (DJA) est utilisé par l'organisation mondiale de la santé (OMS) et d'autres organismes et instituts de santé nationaux et internationaux.

Le nouveau terme « exposition journalière admissible » (EJA) est défini selon la directive canadienne (Q3c(r)) comme l'apport admissible de solvants résiduels sur le plan pharmaceutique dans le but d'éviter la confusion avec les valeurs différentes de DJA et d'AQT pour la même substance [30].

- Solvants de la classe I :

Ce sont des solvants fortement suspectés d'être carcinogènes pour les humains et de présenter des risques pour l'environnement.

- Solvants de la classe II :

Ce sont des carcinogènes non génotoxiques pour les animaux ou agents causals d'autres effets toxiques irréversibles, comme des effets neurotoxiques ou tératogènes.

Ces solvants sont soupçonnés d'avoir d'autres effets toxiques importants mais réversibles

- Solvants de la classe III :

Ce sont des solvants peu toxiques pour l'homme ; aucun seuil d'exposition n'ayant trait à la santé n'est nécessaire. L'EJA pour les solvants de classe III est supérieure ou égale à 50 milligrammes (mg) par jour [30].

Les classements de solvants sont disponibles en annexe dans les tableaux I à III.

#### **2.2.3.4. Conséquences sur l'homme**

La présence de solvants résiduels dans un produit pharmaceutique peut lui conférer une odeur désagréable pouvant favoriser son refus. On peut citer le cas d'un principe actif cristallisé ayant subi un lavage avec de l'éther isopropylique à priori non prévu dans le protocole de fabrication. Le soluté buvable préparé à partir de ce principe actif contenait 100 ppm de ce solvant, ce qui suffisait à conférer au médicament une odeur éthérée que la majorité des utilisateurs ne supportait pas ; le lot incriminé a dû être retiré du marché [8].

La toxicité des solvants résiduels est due à leur forte affinité chimique avec les organes riches en lipides. Ils sont capables de traverser les barrières membranaires en raison leur liposolubilité et exercent une action tératogène [35].

Le foie et le rein chargés respectivement de la détoxication et de leur élimination sont les organes les plus exposés.

La métabolisation de ces solvants conduit souvent à la formation de radicaux libres. Ces derniers peuvent se lier à des molécules protéiques (ADN, protéines) et exercer leur action carcinogène : c'est l'exemple du benzène dont l'utilisation est strictement limitée en industrie pharmaceutique [30].

De façon générale la toxicité des solvants résiduels se caractérise par :

- des actions neurotoxiques centrales ou périphériques ;
- des atteintes mucocutanées ;
- des troubles digestifs, hépatiques ou rénaux ;
- éventuellement, des troubles du système de reproduction [35].

Cette toxicité des solvants résiduels explique l'intérêt de leur recherche et leur dosage dans les produits pharmaceutiques.

#### **2.2.3.5. Interactions solvants résiduels et molécule (s) active (s)**

Les solvants (y compris l'eau) peuvent présenter des interactions avec les substances solides. Ils peuvent être absorbés sur la surface du cristal et, en général, seront facilement enlevés au moment du séchage du fait des faibles énergies d'interaction mises en jeu. Ils peuvent être occlus (clathrates) intégrés plus ou moins dans la maille cristalline et difficilement enlevables sans un chauffage important qui risque en retour de dégrader la molécule. Ils peuvent aussi se lier de façon symétrique avec la molécule active [8].

#### **2.2.4. IMPURETES STEREOCHIMIQUES**

L'isométrie définit la structure de deux substances ayant la même formule moléculaire et dont les liaisons entre atomes sont différentes (cas du 1-propanol et 2-propanol ou isopropanol) [54].

Karl Fisher a défini les règles de représentation des isomères dont un exemple est illustré ci-dessous avec le glycéraldéhyde.

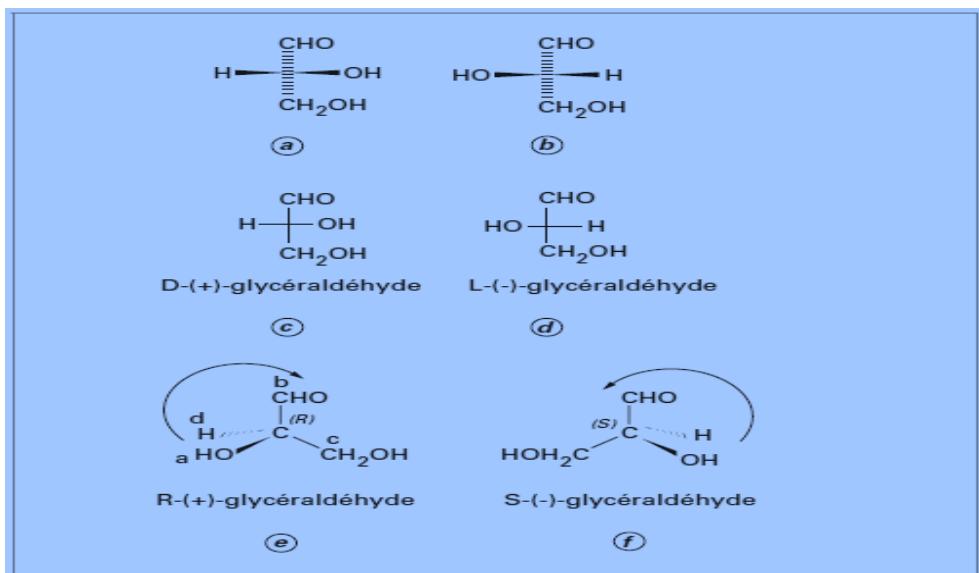


Figure 3 : Représentation des énantiomères du glycéraldéhyde selon la convention de Fisher et selon la règle des séquences [54].

La présence d'un (ou plusieurs) carbone(s) asymétrique(s), formant ainsi un (des) centre(s) de chiralité, peut engendrer des propriétés différentes pour chaque isomère [54]. Ceci peut conduire aussi bien à des propriétés thérapeutiques différentes, que des toxicités différentes.

Pour minimiser certains effets toxiques les chimistes les utilisent souvent sous forme de mélange racémique.

La lévodopa est un précurseur de la dopamine, utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson. Elle possède un centre de chiralité qui permet la formation de deux énantiomères. Seul l'énantiomère lévogyre (S)-(-) est conservé dans ce médicament. L'autre énantiomère, dextrogyre (R)-(+), est quant à lui toxique, et entraîne des risques d'agranulocytose. Il ne doit donc pas être présent dans le médicament final, ou du moins en quantité très faible conformément aux limites tolérées [37].

La bupivacaïne, largement utilisée en tant qu'anesthésiant, présente un risque de toxicité cardiaque et de toxicité du système nerveux central sous sa forme de mélange racémique, à cause de l'énantiomère (R)-(+). L'isomère lévogyre (S)-(-)

) a été commercialisé afin de réduire ces risques, sous la forme de la lévobupivacaïne.

Il en va de même pour la ropivacaïne, dont seul l'énanthiomère (S)-(-) est retenu du fait d'un risque d'action arythmogène de l'énanthiomère (R)-(+). Celui-ci possède en outre une action thérapeutique beaucoup plus faible et de plus courte durée que son antipode lévogyre.

Le dexambutol, ou (S, S)-(+)-éthambutol, est quant à lui le seul isomère utilisé en tant qu'antituberculeux, car les autres isomères, (R, R)-(-)-éthambutol et le dérivé méso (R, S), sont écartés du fait de leur grande toxicité [37, 54].

### **2.3. Aspects réglementaires des impuretés**

Jusqu'au début du XXème siècle, les produits médicamenteux ont été produits et vendus sans qu'aucun contrôle ne soit imposé. Beaucoup de médicaments brevetés avaient une valeur douteuse. Certains étaient nuisibles et provoquaient une dépendance.

En 1937, l'éthylène glycol utilisé comme véhicule pour l'élixir de sulfamide a causé plus de cent morts [76].

Depuis cette catastrophe des exigences ont été adoptées et font l'objet de nombreux textes réglementaires.

La FDA et l'ICH établissent une liste d'impuretés qui doit être incluse dans les spécifications d'une nouvelle substance médicamenteuse. Ces exigences formulent les normes légales de qualité, de pureté et d'efficacité des nouveaux médicaments. Elles ont un certain nombre d'avantages, tant pour l'industrie que les autorités réglementaires [3 ; 31].

Les bonnes pratiques industrielles fournissent des normes de qualité minimales pour la production de produits pharmaceutiques aussi bien que de leurs ingrédients [43].

L'aspect le plus critique de l'élaboration des directives est la définition des niveaux d'impuretés, leur identification et la qualification. La qualification est le

processus d'acquisition et d'évaluation des données pour établir une sécurité biologique d'une impureté individuelle ou un profil d'impuretés donné aux niveaux indiqués [3].

Des procédures analytiques devraient pouvoir séparer toutes les impuretés l'une de l'autre. La méthode utilisée devrait être optimisée pour les séparer et les quantifier dans les formes pharmaceutiques.

L'ICH a harmonisé des exigences dans deux directives (Q2a et Q2b) [33 ; 34]. La première récapitule et définit les caractéristiques de validation nécessaire pour les divers types de procédures de test. La deuxième prolonge le texte précédent pour inclure les données expérimentales exigées et une certaine interprétation statistique.

Il est à noter que les unités analytiques de recherche et développement dans l'industrie sont responsables de la conception et de la validation des méthodes de test.

## **DEUXIEME PARTIE : METHODES DE DOSAGE DES IMPURETES DANS LES FORMES PHARMACEUTIQUES**

## 1. OBJECTIF DE L'ETUDE

- **Objectif général**

Cette étude a pour but d'étudier la qualité des médicaments.

- **Objectifs spécifiques**

- ✓ Lister les différents types d'impuretés ;
- ✓ Décrire les méthodes de dosage des impuretés ;
- ✓ Préciser les domaines d'application des méthodes utilisées.

## 2. METHODES DE DOSAGE DES IMPURETES DANS LES FORMES PHARMACEUTIQUES

Différentes méthodes sont proposées dans la littérature dont le choix dépend :

- des propriétés physico-chimiques de l'impureté ;
- de la sensibilité de la méthode vis-à-vis de l'impureté ;
- de la teneur en impuretés dans l'échantillon à analyser.

### 2.1. METHODES SPECTRALES

#### 2.1.1. Spectrophotométrie (UV-VISIBLE)

Le domaine UV-Visible représente une infime partie du spectre électromagnétique. Cette partie du spectre englobe les radiations perceptibles par l'œil humain. La spectrophotométrie UV-Visible est surtout orientée vers l'analyse quantitative. Elle permet de doser non seulement un composé chromophore mais aussi d'autres composés non chromophores après avoir été transformés par un réactif spécifique [58].

##### 2.1.1.1. Principe

L'absorption de la lumière dans l'UV-Visible par les molécules se produit, comme pour les atomes, du fait de transitions électroniques entre différents niveaux d'énergie.

Un électron à l'état fondamental absorbe des radiations d'une énergie suffisante pour l'élever à un niveau d'énergie supérieur, l'état excité. La différence d'énergie entre deux niveaux est donnée par la relation :

$$E = h \cdot c / \lambda \text{ [13].}$$

- $h$  : constante de Planck ;
- $c$  : vitesse de la lumière ;
- $\lambda$  : longueur d'onde.

### 2.1.1.2. Appareillage

Le spectrophotomètre est conçu autour de trois modules :

- Une source lumineuse ;
- Un système dispersif souvent de type monochromateur ;
- Un système de détection.

### 2.1.1.3. Application à la recherche et au dosage des impuretés : dosage de la benzophénone

La benzophénone constitue l'impureté principale dans la phénytoïne. Les pharmacopées américaine [70] et britannique [10] recommandent que cette impureté soit déterminée respectivement par CLHP et CCM.

Walash et coll., ont développé trois méthodes spectrophotométriques pour l'analyse de la benzophénone dans les formes pharmaceutiques de la phénytoïne [72]. La première méthode constitue une spectrophotométrie de dérivée première ( $D^1$ ), qui absorbe dans l'UV avec une longueur d'onde ( $\lambda$ ) égale à 257,6 nm. La deuxième méthode est une spectrophotométrie UV de dérivée troisième ( $D^3$ ) avec  $\lambda$  égale 263,2 nm. La troisième (DD) constitue à déterminer le ratio du spectre de la dérivée première avec celui de la phénytoïne ( $\lambda=272$  nm).

L'ensemble de ces trois méthodes ont démontré leur efficacité sur la gamme de concentrations de 1 à  $10\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Le tableau ci-dessous illustre les résultats obtenus lors des tests d'exactitude et de fidélité par ajouts dosés.

Tableau III : Données d'exactitude et de fidélité des trois méthodes lors de la détermination de la Benzophénone [72] :

	Paramètres		D <sup>1</sup>	D <sup>3</sup>	DD
même jour	TR%		099,55	099,68	100,09
			099,96	101,36	101,21
			100,34	099,56	099,23
	Moyenne		099,95	100,20	100,18
	Ecart-type		0,39	1,00	0,99
	CV en %		0,39	1,00	0,99
	% d'erreur		0,16	0,41	0,40
Entre jours	jour1		100,10	100,06	100,31
	jour2		100,90	101,59	098,99
	jour3		101,98	100,66	100,11
	Moyenne		100,99	101,43	099,8
	Ecart-type		0,94	0,71	0,71
	CV en %		0,94	0,70	0,71
	% d'erreur		0,38	0,29	0,29

TR% : taux de recouvrement ou taux de récupération

CV : Coefficient de Variation

L'exactitude et la fidélité de la méthode sont vérifiées sur l'intervalle de dosage.

Les moyennes trouvées sont incluses dans l'intervalle toléré par les normes pharmaceutiques (80 à 120%) [27 ; 60].

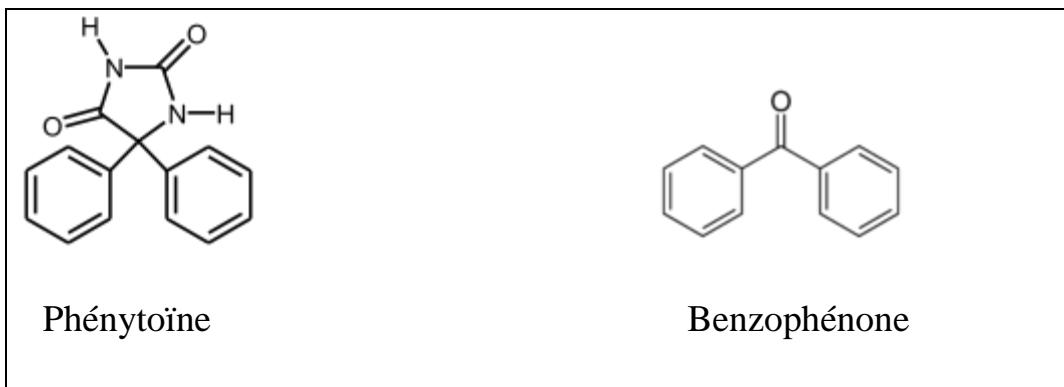


Figure 4 : Structures de la phénytoïne et son impureté principale [10 ; 70].

## 2.1.2. Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES)

### 2.1.2.1. Principe

La spectrométrie d'émission atomique fonctionne sur le même principe que la spectrométrie d'absorption. Dans l'émission, l'échantillon est la source lumineuse. En effet, en excitant thermiquement, les atomes émettent des photons et permettent d'obtenir le spectre de raies des atomes présents dans l'échantillon. En ICP-AES, la source lumineuse est un plasma généré par couplage inductif.

Un plasma est un gaz atomique électriquement neutre mais très ionisé. Il est constitué d'atomes neutres (atomes du gaz) et autant de charges positives (cations du gaz) que négatives (électrons).

Le plasma le plus utilisé est le plasma d'argon car l'argon ne se recombine pas avec les espèces chimiques d'une façon stable et possède un potentiel d'ionisation très élevé (15,6 ev), ce qui permet l'excitation de la majorité des ions [16].

### 2.1.2.2. Appareillage

Le spectromètre ICP-AES peut être divisé en quatre parties :

- Un système d'introduction de l'échantillon ;
- Un système d'atomisation et d'excitation ;
- Un système optique ;

- Un système de détection.

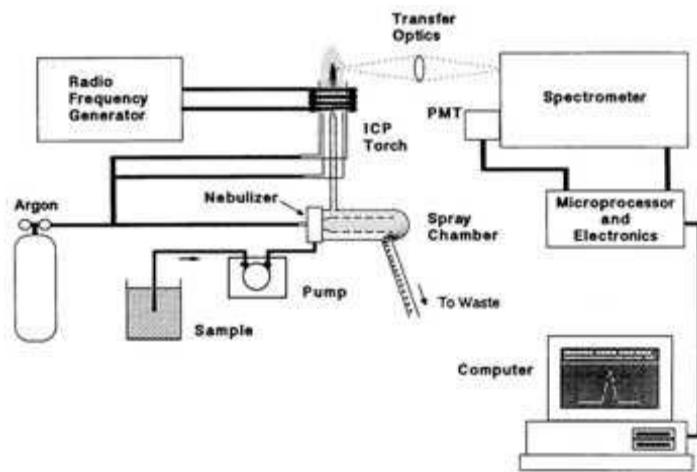


Figure 5 : Schéma de l'appareillage d'un spectromètre ICP-AES [16].

### **2.1.2.3. Application d'ICP-AES : Développement et validation d'une ICP-AES en vue d'une monographie dans la pharmacopée américaine :**

La méthode classique de détection des métaux consiste à une précipitation des sulfures métalliques dans une solution aqueuse puis une comparaison visuelle de la coloration de l'échantillon avec une solution d'étalon de plomb.

Malheureusement, cette technique est jugée inefficace, non spécifique et exige beaucoup de temps et de main d'œuvre.

Pour combler cette insuffisance, la pharmacopée américaine (USP) fait apparaître deux nouveaux chapitres USP< 232> et USP< 233> dont leur mise en œuvre est prévue au premier Mai 2014 [69].

L'USP< 232> décrit les « impuretés élémentaires – limites », celui d'USP< 233> les « impuretés élémentaires – procédures » (méthodes analytiques ICP-AES et ICP-MS).

C'est dans cette optique que Stoving et coll., [65] ont développé une ICP-AES pour être monographie dans l'USP< 233>. Les données de validation ont montré que les limites de détection et de quantification étaient dix fois moins aux

limites de concentration fixées. Cela confirme que la technique d'ICP-AES est bien convenue pour la quantification des métaux lourds.

Exclu l'osmium (Os), la méthode a été jugée exacte et précise. Les taux de recouvrement compris dans l'intervalle 85,3-103,8% et les coefficients de variation entre 1,3-3,2% l'ont confirmé. Par un effet de mémoire, le taux de recouvrement et le coefficient variation pour l'Os sont respectivement 161,5% et 13,7%. En raison de cet effet de mémoire, la méthode aura besoin d'un nouveau développement.

L'application de la méthode (dosage de Fe et de Pt dans un comprimé) a donné respectivement  $182,8\% \pm 18,1$  et  $2,8 \pm 0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ . Ainsi un excès de platine dans ce médicament a été noté (limite tolérée égale  $163 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) [65].

La conclusion tirée est que cette technique peut faire l'objet d'une monographie dans l'USP<233>.

### **2.1.3. Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS)**

Le spectromètre de masse couplé avec ICP est l'une des techniques analytiques les plus sensibles pour la détermination des impuretés inorganiques. C'est la technique la plus utilisée à l'heure actuelle pour l'analyse des métaux lourds dans les produits pharmaceutiques [11].

#### **2.1.3.1. Principe**

Le principe consiste à coupler une séparation par spectrométrie de masse et une ionisation par une torche à plasma.

L'échantillon est introduit dans un flux d'argon porté à haute température se trouvant au centre du spire d'induction à laquelle est appliquée un courant de haute intensité. Le champ magnétique oscillant ainsi créé, accélère les électrons et facilite leurs collisions avec les atomes d'argon. Par l'intermédiaire d'une interface, ils pénètrent dans un analyseur souvent de type quadripôle [57].

### 2.1.3.2. Appareillage

Le schéma suivant présente les composantes de base d'un appareil d'ICP-MS.

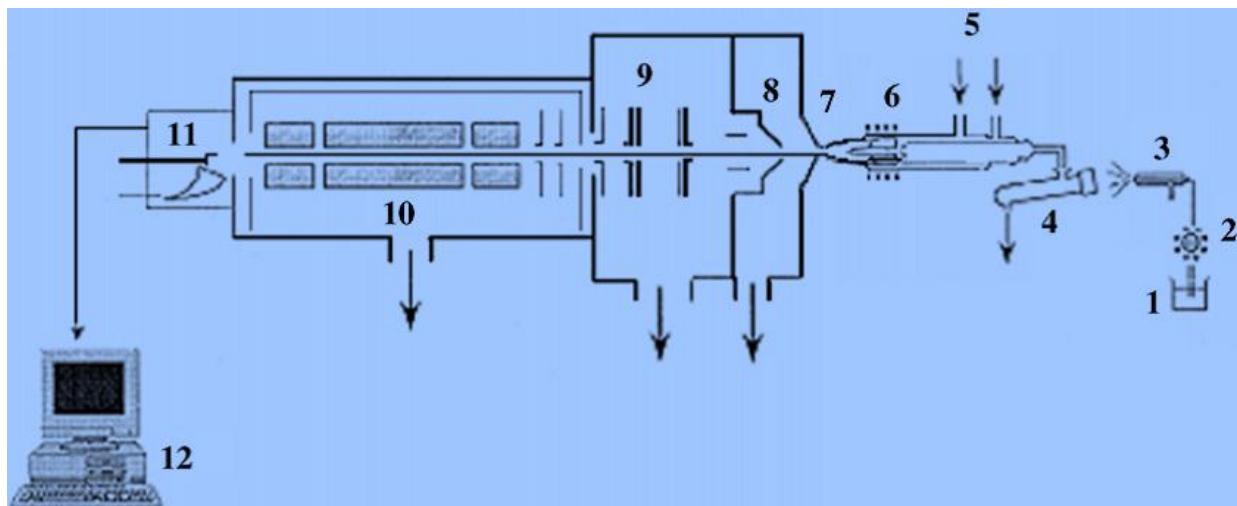


Figure 6 : Diagramme schématique d'un ICP-MS :

(1) échantillon liquide, (2) pompe, (3) nébuliseur, (4) chambre de nébulisation, (5) entrée de la torche à argon, (6) Torche, (7) cône d'échantillon, (8) cône d'écrêtage, (9) lentilles de focalisation, (10) analyseur quadripolaire, (11) photomultiplicateur, et (12) collecteur de données [56].

### 2.1.3.3. Application d'ICP-MS

Lewen et coll., [42] ont utilisé cette technique pour la détermination du palladium dans le sodium forinopril. Le mélange du 2-butoxyéthanol et de l'eau (25/75) a été utilisé comme véhicule en raison de la bonne solubilité du palladium. L'indium a été utilisé comme étalon pour l'analyse quantitative. La méthode a été démontrée linéaire sur la gamme de 2,5 à 50  $\text{ng.ml}^{-1}$  et la limite de quantification était de 0,1  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Aucune interférence matricielle n'a été notée. Les taux de recouvrement dans l'intervalle 1,25-40  $\text{ng.ml}^{-1}$  étaient compris entre 96 et 107% ; le coefficient de variation était de 1,25%. Ainsi la méthode a été proposée pour la détermination des traces de Pd dans les produits médicamenteux [42].

## 2.1.4. Comparaison de quelques méthodes spectrales

### 2.1.4.1. Comparaison entre SAA, ICP-AES et ICP-MS

Les techniques spectrométriques, SAA, ICP-AES et ICP-MS sont largement utilisées pour l'analyse des traces de métaux dans les produits pharmaceutiques.

- La SAA est la technique la plus utilisée pour déterminer les métaux.

Son application en analyse des impuretés est limitée par sa limite de détection élevée. L'avantage est que ses lampes à cathode creuse spécifiques permettent de doser chaque métal.

- L'ICP-AES joue un rôle significatif dans l'analyse des produits pharmaceutiques.

Actuellement elle est la technique de routine pour le dosage des métaux lourds dans l'industrie pharmaceutique [64]. Elle est souvent limitée par l'apparition d'interférences spectrales complexes.

- En matière de sensibilité l'ICP-MS est la technique de choix [73]. Elle fournit un service important à l'industrie pharmaceutique dans l'analyse des traces de métaux. Cependant son prix onéreux et l'indisponibilité de références certifiées limitent son utilisation pour la plupart des produits pharmaceutiques [56].

### 2.1.4.2. Comparaison entre ICP-MS et ICP-AES : Exemple de dosage des métaux dans les comprimés d'Amphétamine [14] :

L'étude avait pour but de comparer l'ICP-MS et l'ICP-AES. Elle consistait à doser les ions métalliques supposés présents dans les comprimés d'amphétamine. Ces ions métalliques peuvent provenir de différentes sources :

- les diluants : Na, Ca, Ba (sulfate, phosphate) ;
- les lubrifiants : Mg, Zn, Al (stéarate) et B (acide borique) ;
- les catalyseurs : Pb, Pt, Ni etc. ;
- les réducteurs :  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ,  $\text{Al/HgCl}_2$  ;

- la préparation des cétones : Fe/HCl, SnCl<sub>2</sub>, Pb(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub>/CuCl, MeZnI, etc. ;
- divers : TiO<sub>2</sub> (E 171).
- Les colorants : I (E 127), Fe (E 172), Cu (E 141).

L'étude a été réalisée avec un ICP-MS de marque Perkin Elmer Elan 600 et un ICP-AES de marque Perkin Elmer Emission Spectrometer Plasm 1000.

Le tableau IV suivant illustre les limites de détection obtenues avec l'ICP-MS et l'ICP-AES (voir tableau IV page 35).

Tableau IV : Comparaison de limites de détection entre ICP-MS et ICP-AES [14]

Eléments	ICP-AES (en ppm)	ICP-MS (en ppm)	Ratio
Ca	0,05	0,0346	1,4
Ba	0,005	0,003	1,7
Al	0,1	0,0381	2,6
Zn	0,1	0,0289	3,5
Mg	0,1	0,0252	4,0
Fe	0,1	0,0136	7,4
Na	0,5	0,0375	13,3
Sr	0,005	0,0003	16,7
Ti	0,1	0,005	20,0
Si	0,1	0,0038	26,3
Cu	0,05	0,0016	31,3
B	0,1	0,0014	71,4
V	0,1	0,0014	71,4
K	2,0	0,0256	78,1
Mn	0,05	0,0004	125,0
Ni	0,2	0,0013	153,8
Cr	0,2	0,0008	250,0
Pb	0,2	0,0005	400,0
Co	0,2	0,0003	666,7
Pt	0,2	0,0002	1000,0

Pour l'ensemble des métaux analysés, les valeurs de limite de détection obtenues en ICP-MS étaient plus faibles que celles obtenues en ICP-AES. Les limites de détection variaient entre 0,005 à 2,0 ppm pour l'ICP-AES et de 0,0002 à 0,0381 ppm pour l'ICP-MS. Les résultats ont montré que l'ICP-MS a une sensibilité meilleure que celle de l'ICP-AES.

### **2.1.5. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique qui repose sur le magnétisme du noyau. Elle est fondée sur la mesure de l'absorption d'une radiation dans le domaine des fréquences radio par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. Cette méthode s'oriente surtout dans l'analyse qualitative (détermination de la structure des molécules). Son utilisation en analyse quantitative s'intensifie de jour en jour et s'apprête à être utilisée en routine dans l'industrie pharmaceutique [58].

#### **2.1.5.1. Appareillage**

Il est constitué des éléments ci-après :

- Un aimant pour la création du champ magnétique ;
- Une source de radiation électromagnétique de fréquence appropriée ;
- Une unité de balayage de fréquence dans tout le domaine des absorptions ;
- Une cellule contenant l'échantillon ;
- Un détecteur ou récepteur de radiofréquence ;
- Un enregistreur qui trace l'énergie absorbée en fonction de la fréquence.

#### **2.1.5.2. Application de la RMN à la recherche et au dosage d'impuretés**

Le dosage par RMN est possible à la seule condition que l'on puisse trouver au moins une bande de résonance de l'impureté à doser, qui soit bien isolée et qui ne soit pas superposable avec d'autres bandes appartenant à d'autres produits.

En pratique, la méthode du standard interne est souvent utilisée pour la quantification des impuretés.

Le principe du dosage consiste à extraire, à l'aide d'un volume bien déterminé de solvant convenable, l'impureté à doser et à ajouter à la solution une quantité connue d'un étalon interne.

Le choix d'une référence appropriée est indispensable pour la quantification en RMN. Le composé de référence doit être pur, soluble dans le solvant utilisé, stable et donner un signal qui ne se superpose pas avec le signal de l'analyte [58].

Il y'a d'autres méthodes de dosage telles que la méthode des ajouts dosés. Elle consiste à ajouter dans l'échantillon avant, pendant ou après sa préparation des quantités connues de l'analyte. On examine alors si la réponse de l'instrument de mesure correspond au signal initial augmenté du signal correspond à la quantité ajoutée.

La RMN  $^{19}\text{F}$ , a été utilisée par Saleh (2007) pour le dosage de la ciprofloxacine. La ciprofloxacine a plusieurs impuretés associées qui sont bien décrites et définies dans la pharmacopée européenne (figure 7). Les impuretés A, B et D sont des sous-produits qui proviennent de la voie de synthèse, l'impureté C est un produit de photodégradation, l'impureté E, un produit de dégradation résultant de la décarboxylation de la ciprofloxacine et enfin l'impureté F un produit d'hydroxylation [23].

Pour le dosage de la ciprofloxacine et de ses impuretés, le para-fluorobenzoate est utilisé comme référence [68].

L'étude a révélé que les résultats de ce dosage sont semblables à ceux de la CLHP. Cette dernière est choisie comme méthode de référence pour le dosage des quinolones et de leurs impuretés dans la pharmacopée européenne [23].

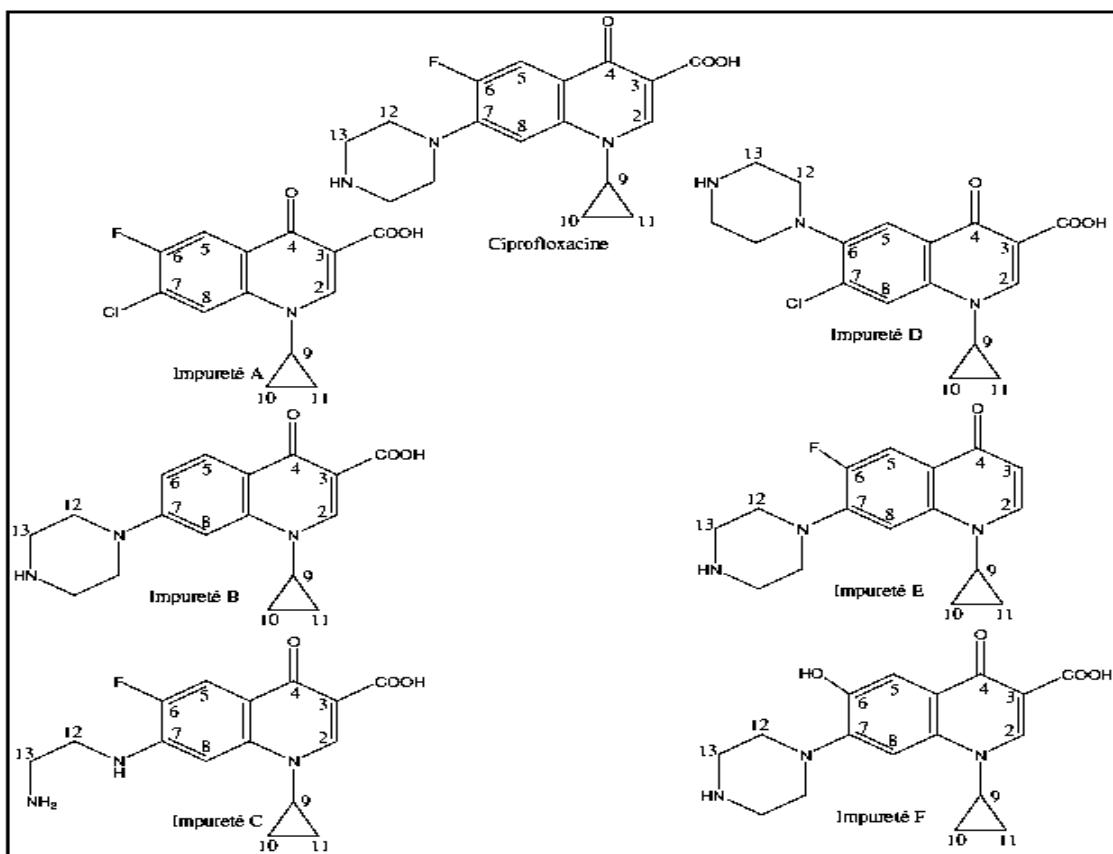


Figure 7 : Structures de la ciprofloxacine et de ses impuretés connues [23].

**Ciprofloxacine** : Acide 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(pipérazine-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté A** : Acide 7-chloro-1-cyclopropyl-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté B** : Acide 1-cyclopropyl-4-oxo-7-(pipérazine-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté C** : Acide 1-cyclopropyl-7-(éthane diamine-1yl)-6-fluoro-4-oxo-7-(pipérazine-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté D** : Acide 7-chloro-1-cyclopropyl-4-oxo-6-(pipérazine-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté E** : 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(pipérazine-1-yl)-1,4-dihydroquinoline.

**Impureté F** : Acide 1-cyclopropyl-6-hydroxy-4-oxo-7-(pipérazine-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

## **2.2. METHODES SEPARATIVES**

### **2.2.1. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES**

Les méthodes chromatographiques sont les techniques les plus utilisées pour l'analyse des impuretés dans l'industrie du médicament. Cela est dû à leur capacité de séparer et de doser ces composés à des teneurs assez faibles dans les médicaments. La chromatographie liquide haute performance (CLHP) s'oriente plus vers la détermination des composés non volatils alors que la chromatographie en phase gazeuse (CPG) s'adresse plutôt aux composés volatils ou volatilisables. Elles sont d'utilisation très répandue [57 ; 62].

#### **2.2.1.1. Principe général**

Le principe repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles.

En chromatographie, l'une des phases, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace à travers la phase stationnaire. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés avec différentes vitesses permettant leur séparation.

#### **2.2.1.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)**

La chromatographie liquide haute performance est plus orientée dans l'analyse des composés organiques non volatils. Elle est d'utilisation très courante du fait de sa spécificité et de sa sensibilité très grande. Ces applications ne cessent d'accroître [57].

##### **2.2.1.2.1. Appareillage**

L'appareillage d'une chaîne CLHP est constitué :

- d'un ou des réservoir(s) de phases mobiles ;
- d'un système de pompage ;
- d'un dispositif d'injection de l'échantillon ;

- des colonnes ;
- des détecteurs.

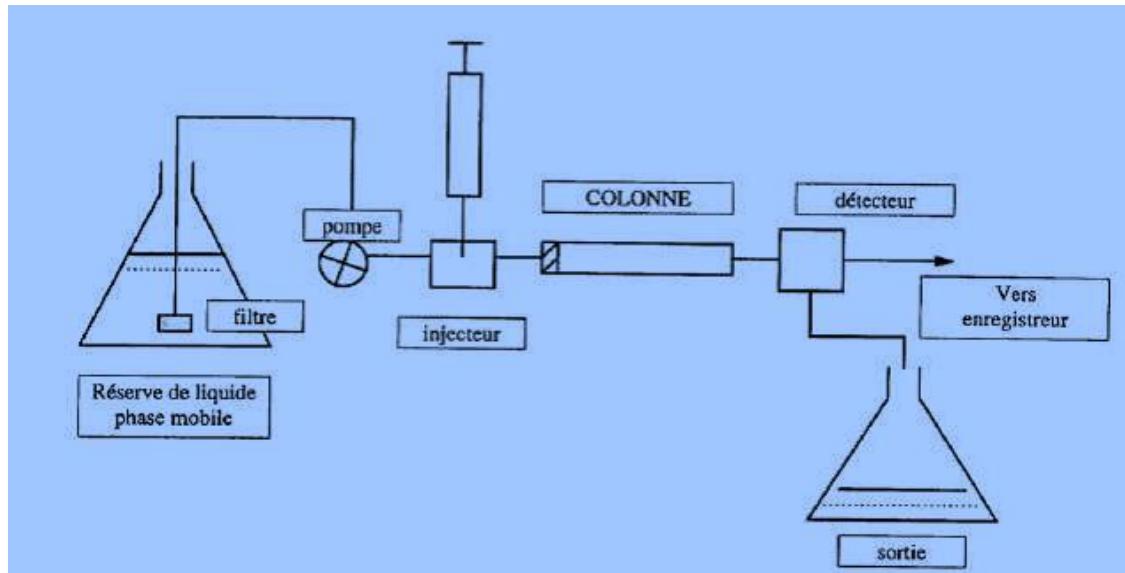


Figure 8 : Schéma d'une chaîne CLHP [53].

La conception des appareils reste la même sauf la variabilité au niveau des détecteurs. Le choix du mode de détection est important pour s'assurer que tous les composés seront détectés.

En CLHP, l'U.V reste le détecteur de choix. Il fournit l'assurance que tous les composés absorbants dans l'U.V sont détectés s'ils sont présents en quantité suffisante [57].

Il faut noter que la plupart des composés organiques présente une absorption dans l'U.V au voisinage de 254 nm.

D'autres techniques de détection peuvent être utilisées (électrochimie, indice de réfraction, fluorescence, conductivité, chiralité etc.) mais dans des applications spécifiques.

Les limites de la CLHP incluent le coût des colonnes, des solvants et un manque de reproductibilité à long terme en raison du vieillissement des colonnes.

## 2.2.1.2.2. Applications de la CLHP : Détermination d'impuretés stéréochimiques

Les séparations chirales ont une grande importance dans le domaine pharmacologique. L'activité d'une molécule thérapeutique peut varier d'une configuration absolue à une autre. Le cas le plus tragique fut celui de la thalidomide, utilisée comme sédatif chez la femme enceinte dont l'une des formes (S)-(-) s'est avérée tératogène [48].

La détermination des impuretés stéréochimiques s'effectue selon deux approches : une approche directe et une approche indirecte [28].

- L'approche indirecte est fondée sur la séparation après dérivation en diastéréoisomères (Figure 9). Le principe de cette technique consiste à modifier la molécule chirale à analyser en la faisant réagir avec un réactif optiquement pur de façon à former deux diastéréoisomères. Ces derniers ont des propriétés physico-chimiques différentes donc séparables dans un environnement achiral avec des phases stationnaire et mobile classiques.

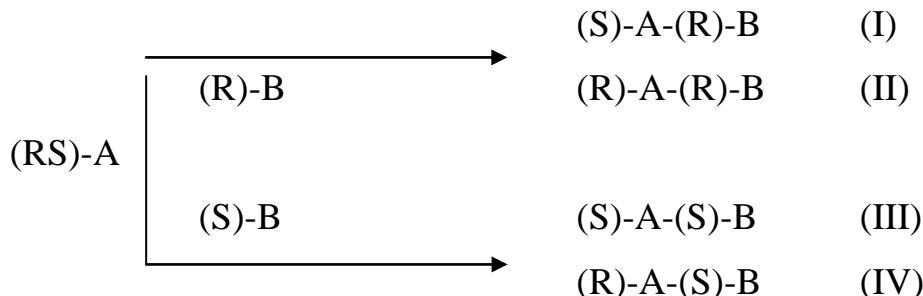


Figure 9 : Formation des diastéréoisomères par l'approche indirecte (dérivation) [28].

- La séparation d'énanthiomère par approche directe, c'est-à-dire sans dérivation au préalable, est devenue de plus en plus fréquente au cours de ces dernières années. L'approche directe permet la séparation directe des composés chiraux selon deux voies distinctes :

La première voie consiste en la séparation chirale après addition de sélecteurs chiraux à la phase mobile (phase mobile chirale) dans les méthodes

chromatographiques, tandis que la deuxième voie repose sur la séparation au moyen de sélecteurs chiraux immobilisés (phases stationnaires chirales).

Exemple : contrôle de la pureté énantiomérique du chlorhydrate d'éphédrine, une molécule avec une configuration 1R, 2S dans la pharmacopée européenne [44].

L'approche indirecte a été abordée permettant la formation de diastéréoisomères de configurations 1S, 2S et 1R, 2R séparables dans un environnement achiral. L'opposé énantiomérique de configuration 1S, 2R est séparé par l'utilisation de la rotation optique.

La CLHP reste une méthode courante dans l'industrie pharmaceutique. Son évolution tend vers le tri-couplage.

Une étude révèle le développement d'une nouvelle méthode qui a été jugée pertinente.

En plus de son couplage avec l'ultra-violet, elle est associée au spectromètre de masse de résonance à cyclotron d'ion de transformée de Fourier (HPLC-UV/FTICRMS).

La méthode a été décrite pour l'enquête du profil d'impuretés de la moxifloxacine (MOX) dans la substance médicamenteuse et dans la substance de référence chimique. Dix impuretés ont été détectées par HPLC-UV, tandis que huit impuretés ont été identifiées par couplage avec la spectrométrie de masse à cyclotron d'ion de transformée de Fourier [75].

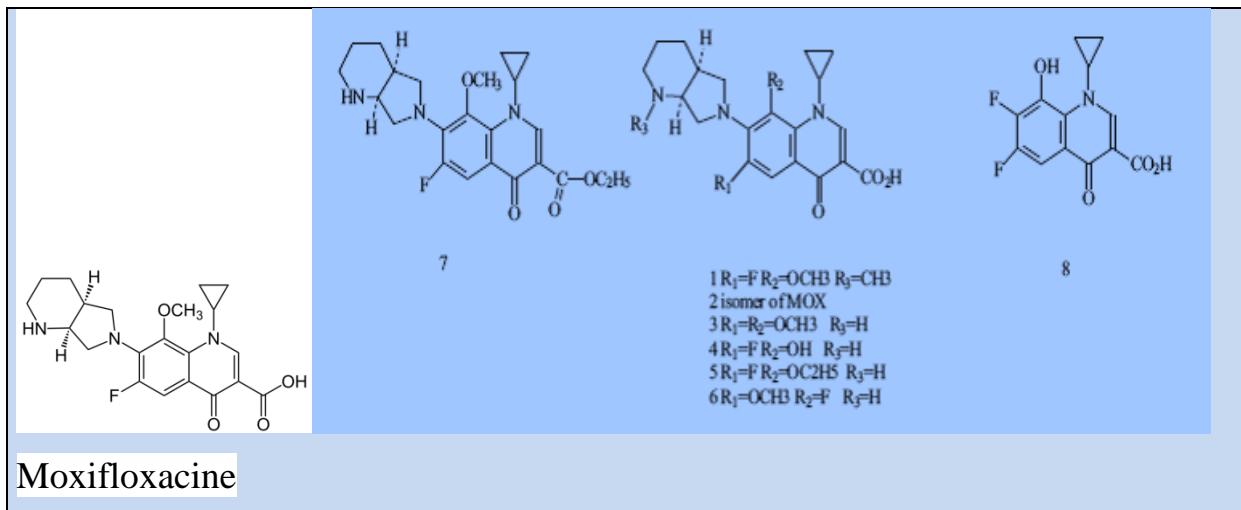


Figure 10 : Moxifloxacine et ses impuretés identifiées par HPLC-UV/FTICRMS [75].

**Moxifloxacine** : Acide 1-cyclopropyl-6-fluoro-8-méthoxy-7[(4aS, 7aS)-octahydro-6H-pyrrolo [3,4-b] pyridin-6-yl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté 1** : Acide 1-cyclopropyl-6-fluoro-8-méthoxy-7[(4aS, 7aS)-octahydro-6H-pyrrolo [3,4-b] méthylpyridin-6-yl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté 2** : Isomère de la moxifloxacine.

**Impureté 3** : Acide 1-cyclopropyl-6,8-diméthoxy-7[(4aS, 7aS)-octahydro-6H-pyrrolo [3,4-b] pyridin-6-yl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté 4** : Acide 1-cyclopropyl-6-fluoro-8-hydroxy-7[(4aS, 7aS)-octahydro-6H-pyrrolo [3,4-b] pyridin-6-yl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté 5** : Acide 1-cyclopropyl-8-éthoxy-6-fluoro-7[(4aS, 7aS)-octahydro-6H-pyrrolo [3,4-b] pyridin-6-yl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté 6** : Acide 1-cyclopropyl-8-fluoro-6-méthoxy-7[(4aS, 7aS)-octahydro-6H-pyrrolo [3,4-b] pyridin-6-yl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylique.

**Impureté 7:** 1-cyclopropyl-6-fluoro-8-méthoxy-7[(4aS, 7aS)-octahydro-6H-pyrrolo [3,4-b] pyridin-6-yl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3- méthanoate d'éthyle.

**Impureté 8 :** Acide 1-cyclopropyl-6,7-difluoro-8-hydroxy-4-oxo-1,4 -dihydroquinoline-3-carboxylique

### **2.2.1.3. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)**

La CPG est destinée à l'analyse des composés organiques volatiles ou volatilisables.

Son principe de séparation repose sur l'affinité de la substance à doser vis-à-vis des phases mobile et stationnaire et des tensions de vapeurs des composés.

#### **2.2.1.3.1. Appareillage**

L'appareillage d'une chromatographie CPG est constitué :

- d'un réservoir de phase mobile gazeuse ;
- d'un injecteur qui entraîne la phase mobile dans la colonne ;
- d'une colonne souvent de type capillaire, tapissée par une phase stationnaire ;
- d'un four permettant de travailler avec une température constante ou avec un gradient de température ;
- des détecteurs.

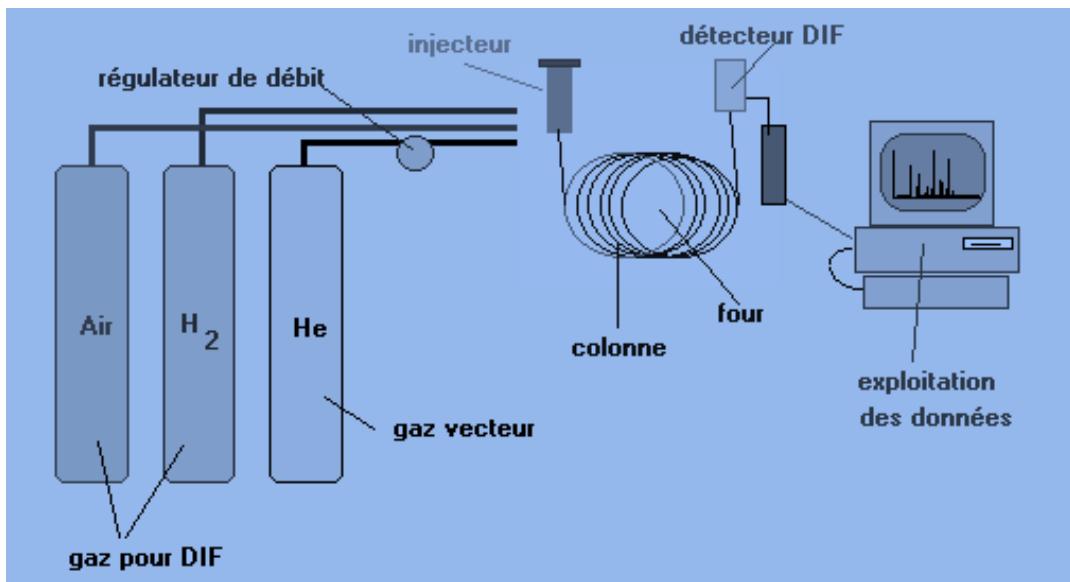


Figure 11 : Schéma général d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme [58].

La chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF) est la méthode de première intention. La chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse (CPG-SM) est souvent utilisée comme dernier recours [58].

#### 2.2.1.3.2. Applications de la CPG au dosage des impuretés

La CPG-DIF a été utilisée pour la quantification des résidus du propan-2-ol, du méthanol et du toluène dans l'hydrate du sulfonate de méthane (2a, 6a, 8a, 9a $\beta$ )-octahydro-3-oxo-2,6-méthane-2H-quinolizin-8-yl-1H-indole-3-carboxylate, un antagoniste des récepteurs de la sérotonine.

Le méthanol et le toluène ont été utilisés lors de la dernière étape de la synthèse du produit. Le propan-2-ol quant à lui a été utilisé lors de l'étape finale de recristallisation.

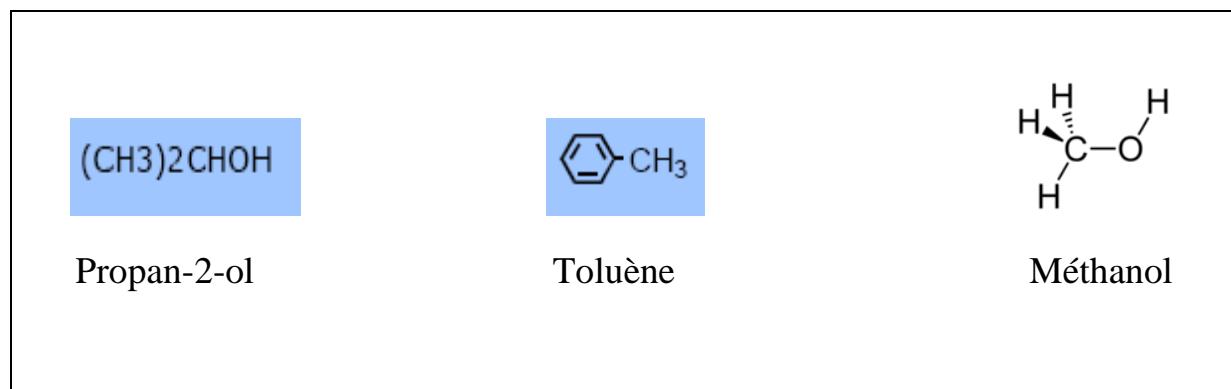


Figure 12 : Structures du propan-2-ol, du toluène et du méthanol [35].

La quantification de ces solvants a été faite avec la chromatographie en phase gazeuse couplée au DIF [7].

Une colonne capillaire a été utilisée avec du diméthylpolisiloxane comme phase stationnaire. Le four était animé d'un gradient de température allant de 45°C à 145°C. Le propan-1-ol constituait l'étalon interne. Une solution de quantité connue de méthanol, propan-2-ol et de propan-1-ol a été préparée en guise de solution de référence.

La méthode a été jugée efficace sur l'intervalle de dosage. Malgré le changement de quelques paramètres (temps, colonne), aucune divergence n'a été notée sur les résultats (tableaux V et VI).

Tableau V : Données de reproductibilité de la méthode pour le toluène [7].

Quantité introduite (% v/v)	Quantité retrouvée		Moyenne (n=2)
	Colonne1	Colonne2	
0	< 0,01	< 0,01	< 0,01
0,01	0,01	0,01	0,01
0,05	0,05	0,05	0,05
0,1	0,11	0,08	0,10

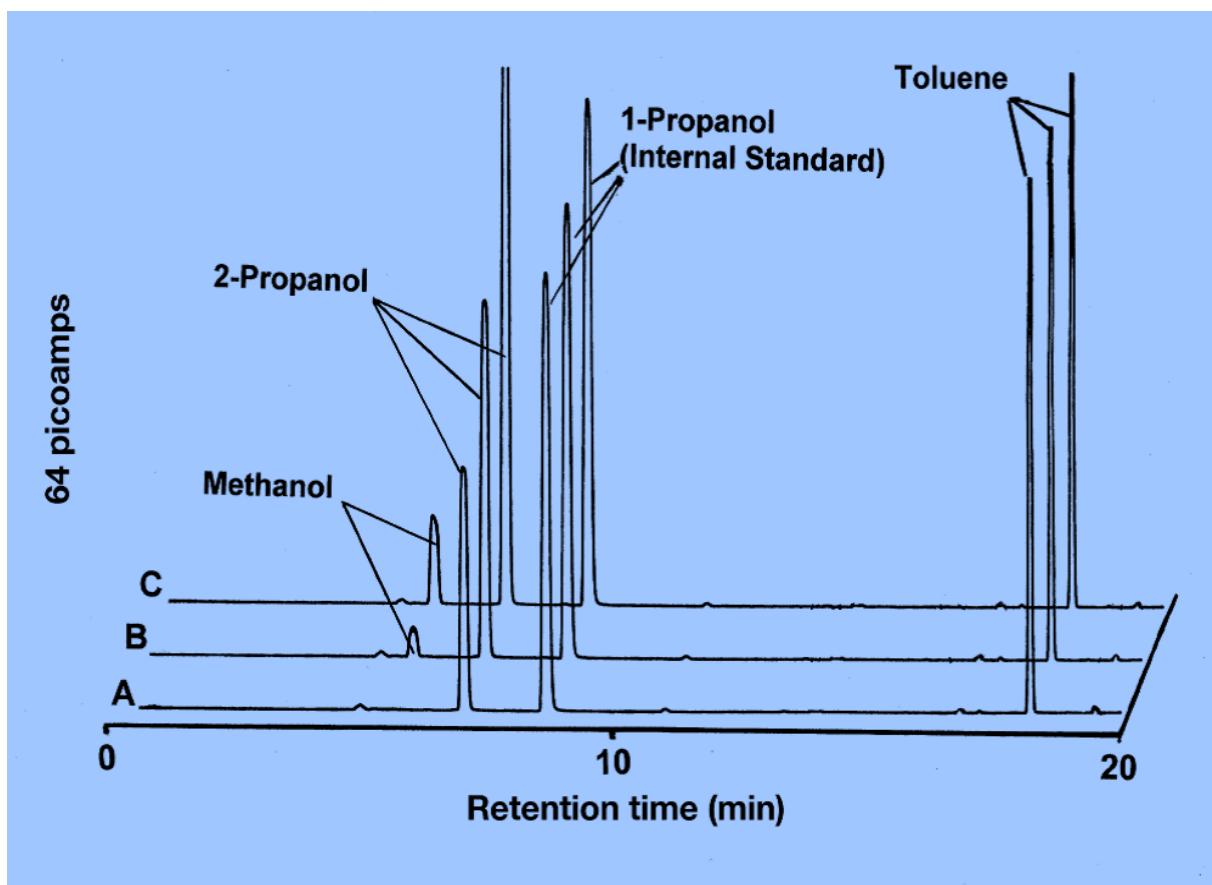
Les colonnes 1 et 2 sont de même nature (Supelco SPB-1 (diméthylpolisiloxane)) mais de lots différents.

Tableau VI : Données d'exactitude de la méthode pour le propan-2-ol et le méthanol [7].

		Quantité retrouvée			
Quantité introduite (% v/v)	Solvants	Jour1	Jour2	Jour3	Moyenne (n*=3)
<b>0</b>	méthanol propan-2-ol	0 0,26	0 0,26	0 0,25	0 0,26
<b>0,05</b>	méthanol propan-2-ol	0,11 0,36	0,11 0,36	0,11 0,36	0,11 0,36
<b>0,1</b>	méthanol propan-2-ol	0,31 0,56	0,31 0,56	0,33 0,55	0,32 0,56
<b>0,3</b>	méthanol propan-2-ol	0,61 0,86	0,61 0,86	0,63 0,85	0,62 0,86
<b>1,0</b>	méthanol propan-2-ol	1,02 1,25	1,03 1,26	1,04 1,26	1,03 1,26

\*nombre d'essai

Le schéma ci-dessous illustre les chromatogrammes obtenus lors des tests d'exactitude où la proportion en alcools dans l'échantillon était de 0% ; 0,1% et 0,3% (v/v).



Le développement de cette technique ne cesse d'accroître. Djavanshir et coll., ont utilisé cette technique pour quantifier la pyridine (produit de dégradation de la ceftazidime) et les solvants résiduels (acétone, méthylène chloride et diéthylamine), constituant les principales impuretés dans la forme pharmaceutique [17]. La méthode de standard externe est utilisée pour l'analyse

quantitative. La méthode a été jugée linéaire et sensible pour l'ensemble de ses solvants. Les donnés de validation l'ont confirmé, présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau VII : Données de LD, LQ et du coefficient de corrélation ( $r^2$ ) des différentes impuretés [17] :

Analytes	LD (ppm)	LQ (ppm)	coefficient de corrélation ( $r^2$ )
acétone	1,06	3,18	0,996
Méthylène chloride	0,83	2,49	0,997
diéthylamine	0,51	1,53	0,997
pyridine	0,98	2,94	0,998

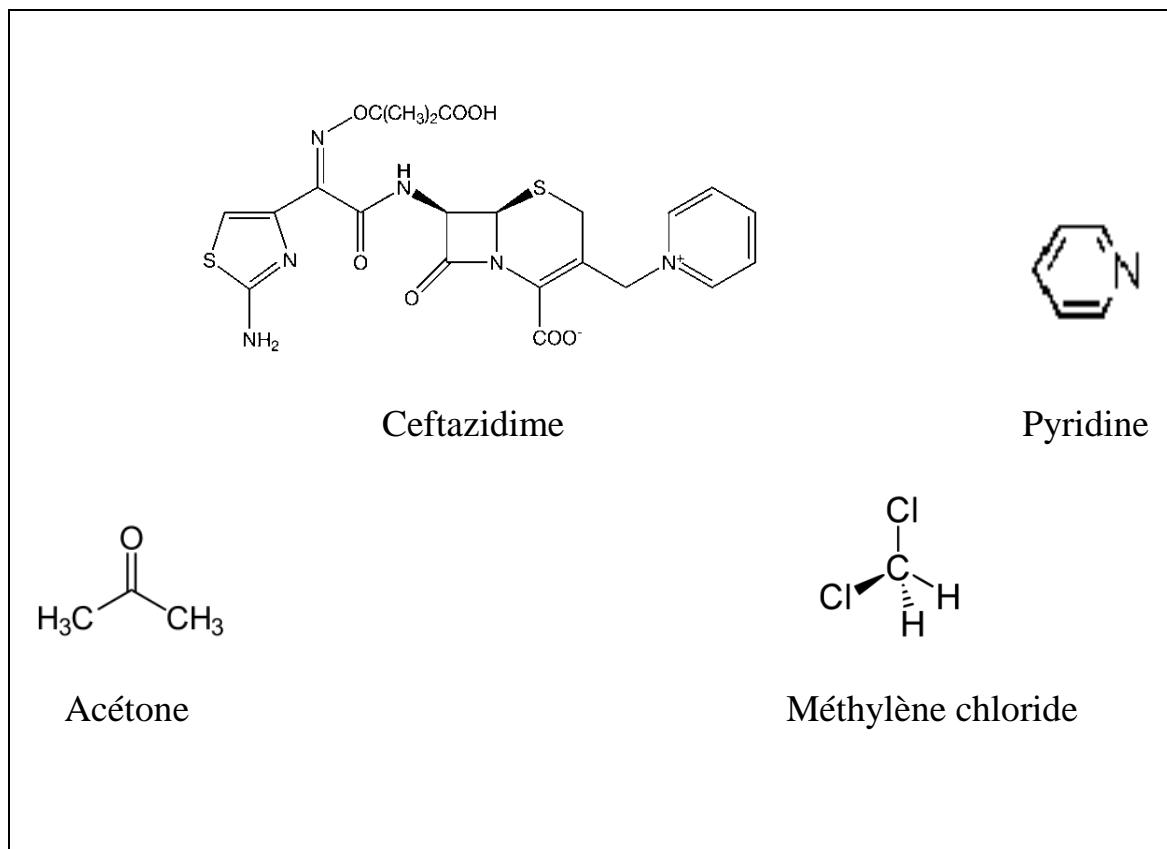


Figure 14 : Structures de la ceftazidime et ses impuretés potentielles [35].

#### 2.2.1.4. Chromatographie ionique (CI)

C'est une technique analytique qui permet l'analyse qualitative et quantitative des espèces ioniques présentes dans un échantillon liquide dépourvu de matières en suspension [61].

Cette technique est devenue intéressante grâce à ses progrès en technologie, regroupés en quatre groupes :

- meilleurs composants chromatographiques ;
  - résines échangeuses de plus grande efficacité ;
  - échantillon de faible volume ;
  - détection automatique.
- ✓ Applications de la chromatographie ionique pour la recherche et le dosage d'impuretés
- Dosage de l'azoture :

L'azoture utilisé dans la synthèse de l'irbesartan (antihypertenseur) peut être détecté comme impureté à l'état de traces dans le produit. La pharmacopée américaine recommande que l'azoture soit déterminé par chromatographie ionique après injection directe [66].

Le groupe Metrohm rend cette technique plus sélective, plus sensible et surtout plus rapide par l'élimination des interférences matricielles [66]. Le tableau suivant illustre les données obtenues lors de la validation.

Tableau VIII : Précision et Rendement de l'azoture [66].

	surface de pic		
	Valeurs moyennes ( $\mu\text{S}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Coefficient de variation (%)	Taux de recouvrement (%)
Dopage 5 $\mu\text{L}$	0,4223	1,96	101,71
Dopage 30 $\mu\text{L}$	2,5754	0,14	103,37

Les coefficients de variation (CV) des dopages de 5 $\mu$ L et de 30 $\mu$ L (n= 3) d'azoture sont respectivement 1,96% et 0,14%. Ces valeurs sont inférieures à 10% (valeur fixée par les normes pharmaceutiques) [27 ; 60] ; la précision de la méthode a été jugée satisfaisante.

Les taux de recouvrement moyens des deux dopages excéderent 100% alors que l'intervalle défini pour les impuretés est de 80 à 120% [27 ; 60]. Donc, l'exactitude de la méthode se confirme.

La figure ci-après montre les chromatogrammes obtenus lors des essais d'exactitude et de précision.

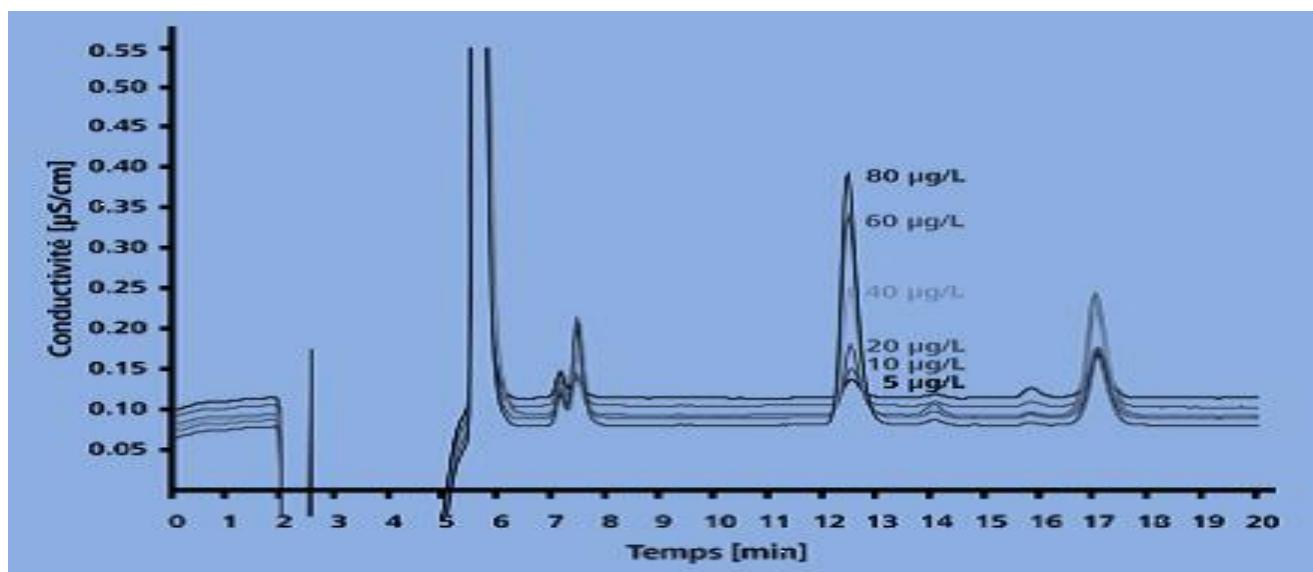


Figure 15 : Chromatogrammes d'un échantillon d'irbesartan dopé avec 5, 10, 20, 40, 60 et 80  $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  azoture.

**Conditions d'analyse :** colonne Metrosep A Supp 10 - 250/4.0 (6.1020.030) ; éluant : 5  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ; 5  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  ; 1,0  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$  ; température de la colonne : 60 °C ; volume d'échantillon : 1000  $\mu\text{L}$  ; élimination de matrice inline avec 70:30 (v/v) méthanol/eau [7].

- Autres applications de la chromatographie ionique.

Tableau IX : Quelques applications de la CI [37]

Analyte	Colonne	Eluent	Détecteur	Description
Nitrite, Nitrate ;	Exsil SAX (125x4, 6 mm) ;	22 mmol.l <sup>-1</sup> dihydrogénophosphate de potassium, 3mmol.dl <sup>-1</sup> d'acide phosphorique avec 20% d'acétonitrile à 1,6 ml.min <sup>-1</sup> ;	UV direct à 214 nm ou détecteur électro-chimique ;	Etude de la dénitrification oxydative des hydroxyguanidines ;
Sulfate, Sulfamate	Hamilton PRP-X100 (150x2, 6 mm) ;	5,8 mmol d'acide parahydroxybenzoïque, 2,5% de méthanol, pH 9,4 à 1,3 ml.min <sup>-1</sup> ;	UV indirect à 310 nm ;	Produits de dégradation de la topiramate ;
Acide oxalique, acide oxamique et l'oxamide ;	Dionex Ion Pac ICE-AS1 (250x9 mm) ;	Acétonitrile 0,1% / acide sulfurique : (5/95) à 8 ml.min <sup>-1</sup> ;	UV direct à 205 nm	Impuretés produites lors de la synthèse ;
N-méthylpyrrolidine ;	Metrohm Metrosep Cation C2-150 ;	6 mmol d'acide nitrique avec 10% d'acétonitrile ;	Conductivité directe ;	Méthode proposée comme alternative de la méthode de la pharmacopée américaine pour la détermination de cette impureté dans l'hydrochloride de céfèpime.

## 2.2.2. Electrophorèse Capillaire (EC)

La reconnaissance de l'EC comme technique d'analyse par les autorités réglementaires autorisant la mise sur le marché des spécialités pharmaceutiques est à la base du développement qu'elle connaît dans les laboratoires de Recherche et Développement et les laboratoires de Contrôle de l'industrie pharmaceutique.

C'est une méthode d'analyse désormais reconnue en raison de ses qualités intrinsèques (efficacité de pic comprise généralement entre 100 et 400 000 plateaux théoriques, résolution élevée, simplicité de la composition du tampon électrophorétique, conditionnement aisément du capillaire, rapidité et automatisation des séparations, faible consommation d'échantillons et de tampons en général dénués de solvants organiques, utilisation possible de nombreux détecteurs (spectrométrie d'absorbance UV, fluorimétrie, conductimétrie et couplage avec la spectrométrie de masse). Elle est d'autre part complémentaire des autres techniques séparatives [24, 67].

### 2.2.2.1. Principe

Le principe repose sur deux mécanismes : l'électromigration et l'électroosmose.

- Electromigration :

Il consiste à une migration des espèces ioniques lorsque celles-ci sont soumises à un champ électrique.

- Electroosmose :

Ce mécanisme correspond à l'écoulement d'un liquide remplissant un capillaire lorsque celui-ci est soumis à un champ électrique tangentiel. Dans le cas d'un capillaire en silice fondu, les charges de surface sont dues à l'ionisation négative des groupements silanols dès que le pH est supérieur à 2 [67].

Les ions cationiques sont injectés du côté anodique de l'EC et détectés du côté cathodique. Leur mobilité s'effectue dans le même sens que le flux électroosmose (FEO).

La surface interne du capillaire étant de charge négative (silice fondu), le FEO se dirige vers la cathode.

Les anions se dirigent vers l'anode contre le flux électroosmotique. Afin d'optimiser la vitesse de séparation, le contrôle du FEO est donc nécessaire.

Trois cas peuvent être envisagés :

- Cas 1 : l'opération s'effectue avec des analytes dont la mobilité électrophorétique est supérieure à celle du flux électroosmotique. Ainsi ils atteindront le détecteur avec un temps relativement long ;
- Cas 2 : On opère avec l'ajout d'un surfactant cationique pour diminuer la vitesse du flux électroosmotique (exemple l'hydroxyde décaméthonium) ;
- Cas 3 : on procède à une modification de la surface du capillaire soit par greffage chimique (eCAP amine), soit par une modification dynamique (polybrène) [21].

### **2.2.2.2. Appareillage**

Il est constitué :

- d'un capillaire de 20 à 100 cm de longueur et 50 à 75 $\mu$ m de diamètre. Ce capillaire est tapissé par de la silice fondu ;
- de deux électrodes reliées par une alimentation de haute tension permettant de délivrer des tensions positives ou négatives allant jusqu'à 30 KV ;
- d'un injecteur qui selon les séparations, a lieu du côté anodique ou cathodique ;
- d'un détecteur (spectrométrie d'absorbance UV, fluorimétrie, conductimétrie et couplage avec la spectrométrie de masse).

### **2.2.2.3. Applications de l'EC pour la recherche et le dosage des impuretés**

L'électrophorèse capillaire est un outil performant qui trouve sa place dans l'industrie pharmaceutique (analyse chirale, dosage et détermination de la pureté des principes actifs).

Une étude révèle son application pour la détermination du N-méthylpyrrolidine. Ce dernier est un produit de dégradation de l'hydrochloride de céfèpime. La céfèpime injectable est inscrite dans les monographies de la pharmacopée américaine et la chromatographie ionique est choisie pour sa détermination en N-méthylpyrrolidine ne dépassant pas 1,0% (v/v) [74].

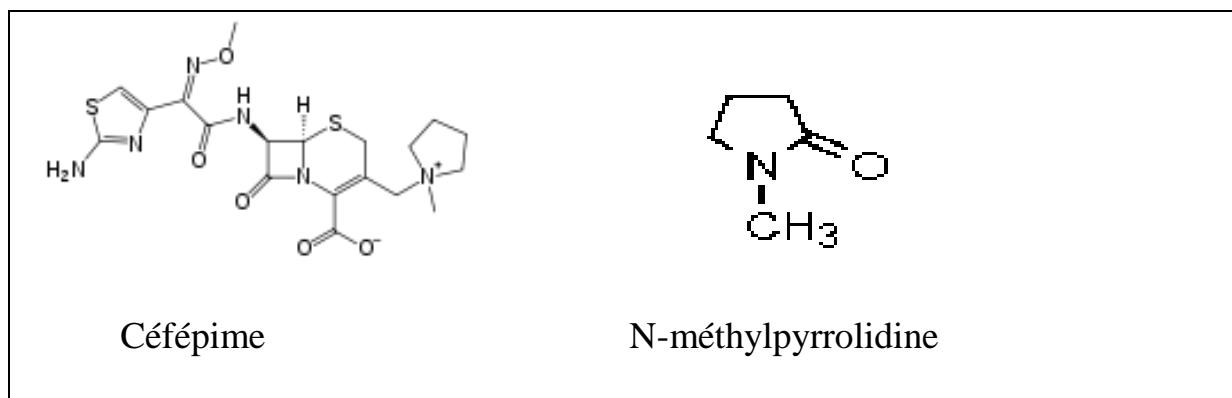


Figure 16 : Structures de la céfèpime et du N-méthylpyrrolidine [35].

L'EC a été utilisée pour la quantification du N-méthylpyrrolidine après son acidification en ion méthylpyrrolidinium, incapable d'absorber en UV [55].

Les résultats ont montré que l'électrophorèse capillaire a beaucoup d'avantages sur la chromatographie ionique pour le dosage du N-méthylpyrrolidine.

Les avantages inclus sont :

- une limite de détection plus faible ;
- un temps d'analyse plus court (10 min pour EC et 35 min pour CI) ;
- un faible coût des réactifs et de la colonne.

L'électrophorèse capillaire tend à être comparable avec la chromatographie liquide haute performance sur plusieurs paramètres :

- Exactitude ;

L'utilisation d'une « technique orthogonale », basée sur un principe différent, est toujours utilisée pour vérifier l'exactitude de l'électrophorèse capillaire. Ainsi, pour la détermination du titre du céfotaxime et du taux de ses impuretés

apparentées, il a été montré que les résultats d'EC sont en bonne concordance avec ceux de la CLHP [12]. Dans le domaine des séparations chirales, une bonne concordance existe entre les résultats de dosage obtenus avec des méthodes d'EC et les séparations chromatographiques sur colonne chirale, comme le montre le dosage de la ropivacaïne (R) dans des solutés injectables de ropivacaïne (S) [59].

- Limite de détection

En général, la limite de détection (en concentration) en EC est supérieure à celle en CLHP. Cependant des impuretés du céfotaxime ont pu être dosées en EC à un taux de 0,02 % (surface du pic/surface totale des pics) alors qu'elles n'étaient pas détectables en CLHP [3].

Des impuretés à des taux inférieurs à 0,05 % ou moins sont couramment détectées ou dosées dans les principes actifs [12].

### **2.3. ELECTROCHIMIE : LA POLAROGRAPHIE**

Le choix de la polarographie dans l'arsenal des méthodes électrochimiques, ressort de sa particularité de son électrode indicatrice : le mercure. Ce métal [29], liquide à température ambiante, permet un renouvellement à la surface active de l'électrode, qui conduit aisément à la formation d'un certain nombre d'amalgames avec les métaux et qui permet des réductions à des potentiels très négatifs.

Le terme « polarographie » se limitait seulement aux techniques utilisant l'électrode à goutte de mercure (EGM), mais actuellement étendu aux techniques avec un film mince de mercure à la surface de l'électrode solide. Grâce à leur sensibilité, les électrodes à couche fine de mercure sont les plus utilisées [1].

La polarographie s'oriente aussi bien vers l'analyse des composés inorganiques que celle des composés organiques. Son application pour la détermination des métaux lourds a connu un essor important au cours de ces dernières années.

Etant donné la florescence des techniques polarographiques, l'étude se limite seulement à la polarographie à impulsions constantes (DPP) et celle à redissolution anodique. Ce choix se justifie par la sensibilité de ces techniques aux concentrations en traces et ultratraces [29].

### **2.3.1. Polarographie impulsionale différentielle (DPP)**

#### **2.3.1.1. Principe**

Le principe consiste à surimposer à l'électrode de travail, une impulsion de potentiel de faible quantité (10 à 100 mV) partant du niveau de tension de base le plus grand.

L'impulsion  $\Delta E$  est appliquée pendant un temps court de 10 à 100 ms à la fin de la vie de la goutte juste avant sa chute provoquée par un dispositif mécanique asservi de frappe du capillaire [29].

#### **2.3.1.2. Application de la DPP pour le dosage de la benzophénone dans les capsules et les suspensions de phénytoïne.**

La benzophénone est l'impureté principale de la phénytoïne. Les pharmacopées américaine [69] et britannique [10] recommandent respectivement la CLHP et la CCM pour sa recherche et son dosage dans la phénytoïne.

Omayma et coll., ont développé une méthode de polarographie impulsionale différentielle (DPP) pour la détermination de la benzophénone dans la phénytoïne [49].

La méthode a été jugée efficace. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de la CCM de la pharmacopée britannique.

La validité de la méthode a été examinée dans différents points :

- Fonction de réponse ;

L'étude a montré une relation linéaire entre le pic du courant et la concentration de la benzophénone sur une gamme de 0,5 à 3,0 g.ml<sup>-1</sup>.

L'équation de la droite s'écrit :  $C = 0,526 + 71,012.I$

C : concentration en g.ml<sup>-1</sup> ;

I : intensité en nA.

- Exactitude ;

L'exactitude de la méthode a été calculée par des ajouts dosés de benzophénone. Le taux de récupération moyen a été estimé à  $100,3 \pm 0,60\%$ , valeur incluse dans l'intervalle défini par les normes pharmaceutiques (80-120%) [27 ; 60].

- Robustesse

Elle a été jugée satisfaisante. Malgré la variation du pH, les résultats ne sont pas affectés.

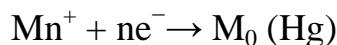
Ainsi la CLHP peut être plus sélective mais les avantages pratiques de la polarographie (rapidité, simplicité et accessibilité) la rendent plus appropriée pour le contrôle en routine de la benzophénone dans la forme pharmaceutique de la phénytoïne.

### **2.3.2. Polarographie à redissolution anodique**

#### **2.3.2.1. Principe**

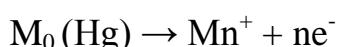
Le principe repose sur deux étapes : une étape d'électrodéposition et une étape de redissolution et de mesure.

- Etape d'électrodéposition : elle consiste à appliquer un potentiel  $E_p$  inférieur au potentiel de demi-vie de l'électrolyte à analyser. Dans le cas où la solution contient beaucoup d'analytes,  $E_p$  doit être inférieur au potentiel de demi-vie le plus faible des analytes. Ainsi, il se forme des amalgames entre les analytes et le mercure voire l'équation suivante :



- Etape de redissolution et de mesure

Un balayage de potentiels des plus négatifs vers les plus positifs permet ensuite de redissoudre les métaux accumulés (équation ci-après) lors du passage par leur potentiel d'oxydoréduction. Le pic de redissolution correspond au métal analysé et l'intensité de ce pic est proportionnelle à la quantité d'ions métalliques redissous dans l'échantillon :



### 2.3.2.2. Application de la polarographie à redissolution anodique

La polarographie à redissolution anodique a été beaucoup appliquée dans l'analyse de traces et ultratraces de métaux. Ces derniers se présentent sous leur forme réduite, solubles dans le mercure.

La figure 17 illustre la détermination de métaux lourds dans un échantillon d'eau de surface ayant subi une digestion acide avant l'analyse. La méthode appliquée, avec les conditions indiquées dans la légende de cette figure, est adaptée à l'analyse d'eau contenant des métaux lourds ayant des concentrations comprises entre 10 et 500  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . La quantification s'effectue avec la méthode des ajouts dosés dont les résultats pour  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  dans cet échantillon analysé quatre fois, donnent des concentrations moyennes comprises entre 44  $\mu\text{g.l}^{-1}$  pour le cadmium et 221  $\mu\text{g.l}^{-1}$  pour le plomb [29].

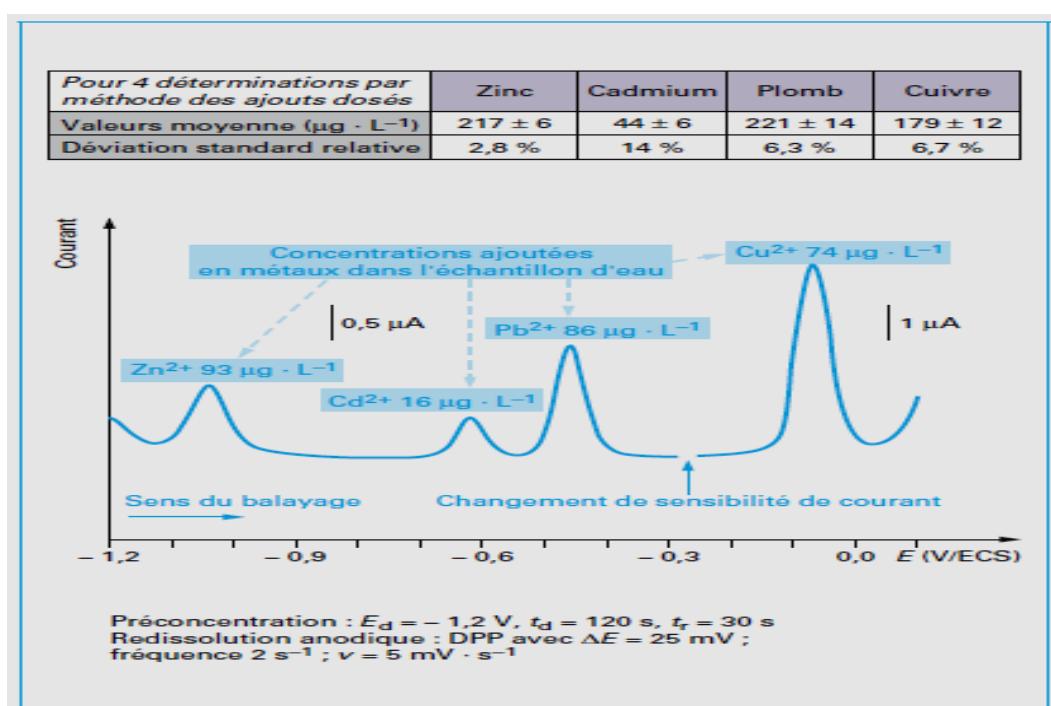


Figure 17 : Polarogramme d'un échantillon d'eau dopé par un ajout de métaux [29].

### 3. DISCUSSION

Plusieurs méthodes analytiques ont été élaborées dans le but de minimiser les problèmes liés aux impuretés. Malgré leur nombre exhaustif, certaines sont d'importance capitale pour la recherche et le dosage des impuretés dans les formes pharmaceutiques.

Les méthodes spectrales ont justifié leur pertinence par de nombreuses applications. Les méthodes spectrophotométriques UV-visible ont permis la détermination de la benzophénone dans la phénytoïne [72]. Les résultats de cette étude (tableau III) ont justifié la fiabilité de ces méthodes. Pour l'ensemble des trois méthodes, les taux de recouvrement sont compris dans l'intervalle 80-120% (intervalle défini par les normes pharmaceutiques) [27 ; 60]. Les coefficients de variation sont inférieurs à 10% (limite maximale pour une impureté individuelle) [60].

L'ICP-AES et l'ICP-MS sont surtout orientés vers l'analyse des impuretés inorganiques. Une méthode d'ICP-AES développée en vue d'une monographie dans la pharmacopée américaine a donné des résultats satisfaisants [65]. Sa validation a montré pour l'ensemble des métaux dosés seul l'osmium dépasse les limites fixées. Les taux de recouvrement compris dans l'intervalle 85,3-103% et les coefficients de variation dans l'intervalle 1,3-3,2% l'ont confirmé.

L'ICP-MS a permis de doser le palladium dans le sodium forinopril [42]. Elle a présenté une linéarité sur la gamme de 2,5 à 50  $\text{ng.ml}^{-1}$ . Les taux de recouvrement pour les concentrations de 1,25 à 40  $\text{ng.ml}^{-1}$  étaient compris entre 96 et 107% et le coefficient de variation était de 1,25% (< à 10%). Ainsi la méthode a été proposée pour la détermination du palladium dans les produits médicamenteux.

Ces deux techniques orientées vers l'analyse des impuretés inorganiques, ont une différence particulière. L'ICP-MS est plus sensible que L'ICP-AES (tableau IV). Sur l'ensemble des métaux dosés, les limites de détection d'ICP-MS

(0,0002 à 0,0381 ppm) étaient plus faibles que celles d'ICP-AES (0,005-2,0 ppm) [14].

La RMN<sup>19</sup>F est particulièrement intéressante pour l'analyse des impuretés fluorées. Elle a été utilisée pour le dosage de la ciprofloxacine et ses impuretés [68]. Les résultats obtenus sont comparables à ceux de la CLHP. Cette dernière est la méthode de référence pour la détermination de la ciprofloxacine et ses impuretés dans la pharmacopée européenne [23]. La RMN ne nécessite pas d'idée préconçue sur la structure de ces impuretés contrairement aux méthodes chromatographiques et électrophorétiques. Ces dernières demandent une connaissance préalable des données physico-chimiques (polarité, présence de chromophores etc.) du composé à doser.

Les méthodes chromatographiques restent les méthodes de choix pour le dosage des impuretés organiques. Elles sont capables à la fois de séparer et de quantifier ces impuretés.

La CLHP et la CPG s'orientent respectivement dans l'analyse des composés non volatils et des composés volatils ou volatilisables. La CLHP constitue la méthode de référence pour la détermination des impuretés stéréochimiques. Elle a permis de séparer le chlorhydrate d'éphédrine (1R, 2S) de son énantiomère (1S, 2R) [44]. La CPG a connu beaucoup d'applications notamment dans l'analyse des solvants résiduels (détermination des traces de solvants utilisés lors de la synthèse et/ou lors de la fabrication). Elle a été utilisée pour la quantification des résidus du toluène, du propan-2-ol et du méthanol dans un produit antagoniste des récepteurs de la sérotonine [7]. Les résultats obtenus de sa validation (tableau V et VI) montrent qu'elle donne des valeurs exactes et reproductibles. Malgré le changement de quelques paramètres (temps, colonne) aucun résultat n'a été impacté.

La CPG a permis aussi de quantifier la pyridine (produit de dégradation de la ceftazidime) et les résidus de solvants (acétone, méthylène chloride et diéthylamine) utilisés lors de la synthèse. La méthode présente une bonne

linéarité. Cela se confirme par des coefficients de corrélation proches de 1(tableau VII) [17].

La CI contribue essentiellement dans l'analyse des espèces ioniques. Elle a fait l'objet de nombreuses applications. Elle est la méthode de référence pour le dosage de l'azoture dans la pharmacopée américaine [66]. En plus, elle a été proposée comme alternative de la méthode de la pharmacopée américaine pour la détermination du N-méthylpyrrolidine dans l'hydrochloride de céf épime.

La CI est devenue intéressante grâce à l'amélioration des phases stationnaires permettant un échange d'ions constant et indépendant du pH [61].

Les limites des méthodes chromatographiques incluent le coût des colonnes, de la pompe, des solvants et un manque de reproductibilité en raison du vieillissement des colonnes.

L'électrophorèse capillaire (EC) s'est développée ces dernières années. Les résultats de ses applications montrent qu'elle est parfois plus avantageuse que la CLHP. Elle présente des limites de détection meilleures. Ainsi les impuretés du céfotaxime ont pu être dosées par EC à un taux de 0,002% alors qu'elles n'étaient pas détectables par CLHP [3].

Pour la détermination du N-méthylpyrrolidine, la pharmacopée américaine propose la CI comme méthode de référence [71]. Pour cette même impureté, l'EC s'est montrée plus avantageuse avec une limite de détection meilleure, un temps d'analyse plus court (10 min pour EC et 35 min pour CI) et un coût faible des solvants [55].

L'inconvénient de l'EC est le recours à des modificateurs organiques pour rendre la résolution meilleure.

L'essor des méthodes électroanalytiques particulièrement les méthodes polarographiques, a été noté au cours de cette étude. Ces méthodes étaient en désuétude. Mais, avec l'invention de l'électrode à goutte de mercure par Heyrovsky, elles sont réapparues avec une sensibilité plus élevée.

La polarographie impulsionale différentielle (DPP), une variante des techniques polarographiques, a été appliquée pour le dosage de la benzophénone dans la phénytoïne [49]. Les résultats de cette application montrent que la DPP peut servir d'alternative des méthodes des pharmacopées (CCM et CLHP). Ces dernières sont recommandées respectivement dans les pharmacopées britannique et américaine pour la recherche et le dosage de la benzophénone dans la phénytoïne [10 ; 70]. La DPP a été démontrée linéaire sur la gamme de 0,5 à 3,0g.ml<sup>-1</sup>. Le taux moyen de recouvrement est égal à 100,3±0,60%. Cette valeur est incluse dans l'intervalle défini par les normes pharmaceutiques (80 à 120%) [27 ; 60]. Cela justifie l'exactitude de la méthode. La robustesse a été étudiée en fonction du pH. Mais aucune variation n'a été notée sur les résultats.

Une autre variante des techniques polarographiques a été décrite : la polarographie à redissolution anodique. Elle a présenté beaucoup d'avantages. Elle sert à l'analyse des traces et ultratraces de métaux. Son application pour le dosage du Zinc, du Cadmium, du Plomb et du Cuivre a donné des résultats pertinents (figure 17) [29]. Pour l'ensemble de ces métaux, les coefficients de variation n'excéderont pas 10% (limite maximale) sauf celui du Cadmium qui est de 14%.

Il est à noter que le réel handicap de ces techniques est dû à la toxicité du mercure. Leur avantage est dû à leur faible coût et à la non destruction de l'échantillon.

## CONCLUSION

Les impuretés pharmaceutiques constituent un danger réel pour la santé des populations. Elles peuvent affecter l'organisme partiellement ou son intégralité, créant des désordres physiques et/ou psychiques. Elles peuvent aussi affecter la valeur marchande du médicament en lui conférant une odeur désagréable (solvants résiduels).

De ce fait, leur détermination constitue un enjeu important tant pour les industries pharmaceutiques que les autorités réglementaires. L'objectif est de mettre à la disposition des consommateurs des médicaments de bonne qualité.

Ainsi, des méthodes analytiques sont mise en œuvre pour la recherche et le dosage des impuretés dans les formes pharmaceutiques. Le choix de la méthode dépend de l'impureté à rechercher (propriétés physico-chimiques, limite tolérée) et de la matrice.

Au cours de cette étude, les méthodes les plus adaptées restent :

- les méthodes spectrales dont, certaines d'elles (ICP-AES ou ICP-MS) vont bientôt apparaître comme monographie dans la pharmacopée américaine. Elles sont prévues pour remplacer la méthode classique traditionnelle de détection des métaux lourds (précipitation des sulfures métalliques dans une solution aqueuse puis une comparaison visuelle de la coloration de l'échantillon avec une solution d'étalon de plomb) [69]. La RMN<sup>19</sup>F, par sa spécificité à l'atome de fluor, permet une analyse quantitative des composés fluorés. L'une de ses applications est le dosage de la ciprofloxacine et ses impuretés (A, B, C, D, E, et F).
- les méthodes chromatographiques occupent une place importante dans le dosage des impuretés et ont un champ d'application très large (dosage de tout type d'impuretés). Cela se justifie par leurs nombreuses applications (dosage des impuretés stéréochimiques, des solvants résiduels et des produits de dégradation).
- l'Electrophorèse Capillaire (EC) qui s'avère pertinente. Elle tend à être comparable avec la CLHP. A travers ses caractéristiques intrinsèques

(bonne résolution, automatisme, simplicité du tampon etc.), elle s'applique à la fois à la détermination des impuretés organiques (ropivacaïne (R)) [59] et inorganiques (N-méthylpyrrolidine).

- la polarographie, sa mise en œuvre demande un faible coût d'investissement.

Pour bien évaluer les impuretés pharmaceutiques, certaines conditions sont à remplir :

- un personnel compétent ;
- des méthodes d'analyse validées et appropriées ;
- une accessibilité aux méthodes de dosage (réel handicap des pays en voie de développement).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**[1] ADRAOUI I., AMINE A.**

Détermination des métaux par voie électrochimique.

*Technologies de laboratoire, Université de Paris 12, 2007, 16-21, N°3.*

**[2] AFF et SFSTP.**

Chaine du froid du médicament.

*Guide pratique, 2008, 21p.*

**[3] ALTRIA K.D.**

Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis.

*J Chromatogr A, 1996, 735, 43-56.*

**[4] ANDAs.**

Impurities in drug products.

*Guidance for Industry, US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Department of Health and Human Services, 1998.*

**[5] ANOFOSSI S., BILLIARD E., HENRIOT F., KRAEMER F., LECHENNE L., LEHERISSIER H., LORIN S.**

Les métaux lourds.

*Dossier SAM, 1997, 17-18.*

**[6] ARUPK B.**

Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications.

*Advanced Drug Delivery Reviews, 2007, 59, 64-72.*

**[7] B'HYMER C.**

Evaluation of headspace. GC method for residual solvents in serotonin 5-HT3 antagonist compound.

*J Chromatogr Sci, 2008, 46, 369-374.*

**[8] BAUER M.**

Analyse des solvants résiduels dans les produits pharmaceutiques.

*Techniques de l'ingénieur, (p3268), 20 p.*

**[9] BOULIANNE G.**

Stabilité des médicaments et des produits pharmaceutiques :

*Chimie pharmaceutique - PHA-19692 - Module 13, Université Laval, 2008. [En ligne]. Disponible sur <http://freepdfdb.org/ppt>*

*Consulté le 06 Mai 2013.*

**[10] BRITISH PHARMACOPOEIA:**

The british pharmacopoeia commission.

*The Stationery Office, London, 2007.*

**[11] BROEKAERT J.A.C.**

State-of-the-art and trends of development in analytical atomic spectrometry with inductively coupled plasmas as radiation and ion sources.

*Spectrochim Acta, 2007, 55B, 737-749.*

**[12] CASTANEDA P.G., JULIEN E., FABRE H.**

Cross validation of capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for céfotaxime and related impurities.

*Chromatographia, 1996, 42, 159-164.*

**[13] CLARCK B.J., FROST T., RUSSELL M.A.**

UV Spectroscopy: Techniques, Instrumentation, Data Handling.

*1<sup>e</sup> ed., CHAPMAN & HALL, 1993, 4, 146p.*

**[14] COMMENT S., LOCK E., ZING C., JACOB A.**

The analysis of ecstasy tablets by ICP/MS and ICP/AES.

*Problems of forensic sciences, Vol. XLVI, 2001, 131-146*

**[15] DENIS F.**

Mise en place de processus analytique complexe : Analyse des métaux par ICP-AES.

*Rapport de stage DU en chimie, Université de Strasbourg, 2011.*

**[16] DESBOEufs K.**

Technologie plasma et applications en chimie analytique : ICP-AES et ICPMS.

*Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques (LISA), Université Paris Diderot, UMR CNRS, 2010, 7583.*

**[17] DJAVANSHIR D., ABOLGHASEM J., JAMAL N.**

Ultrasonic assisted SPME Coupled with GC and GC-MS using Pencil Lead as a Fiber for Monitoring the Organic Volatile Impurities of Ceftazidime.

*J Chromatogr Sci, 2008, 46, 680-685.*

**[18] DJIÉWE D.W.**

Formes galéniques administrées par voies entérales.

*UE6 - Pharmacie Galénique : Voies d'administration et Formes Pharmaceutiques, Université Joseph-Fourier, Grenoble, 2011.*

**[19] DRIAD Y.**

Stabilité du paracétamol : Application à un sachet produit en industrie pharmaceutique.

*Thèse Pharmacie, Henry Poincaré- NANCY1, NANCY, 2009.*

**[20] DUPERTUIS Y.M.**

Physical Characteristics of total parenteral nutrition bags significantly affect the stability of vitamins C and B1.

*J Parenter Enter Nutr., 1999, 26, 310-16.*

**[21] EL HADDAD M., LAZAR S.**

Analyse et détermination des ions inorganiques par électrophorèse capillaire zone.

*Les technologies de laboratoire, Université Hassan II-Mohammedia, 2007, N°3,12-15.*

**[22] EMEA.**

Guideline on the limits of genotoxic impurities.

*Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP CPMP/SWP/5199/02), London, 2006.*

**[23] EUROPEAN PHARMACOPEIA.**

Ciprofloxacin monograph.

*5th ed., 2005, 1300-1301.*

**[24] FABRE H.**

Validation des méthodes d'électrophorèse capillaire appliquées à l'analyse des composés pharmaceutiques.

*ANALYSIS, 1999, N°2, 27, 156-169.*

**[25] FADHILA S.B.**

Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4 éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique

des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin.

*Thèse Science, Toulouse III- Paul Sabatier, 2011.*

**[26] GIRAUT C., SARRUT B.**

Tables d'utilisation des médicaments.

*4<sup>e</sup> ed., Paris : Frison Roche, 1998.*

**[27] GREEN J.M.**

A Pratical Guide to Analytical Method Validation.

*Analytical Chemistry News & Features, 1996, 305A-309A*

**[28] HAROUM M.**

Phases stationnaires chirales à base de teicoplamine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énanthiomères d'acides aminés.

*Thèse science, Université Joseph Fourier, Grenoble I, 2007.*

**[29] HAUCHARD D.**

Polarographie : Principes d'application et mise en œuvre des techniques polarographiques.

*Techniques de l'ingénieur, 2011, (p2136), 30p.*

**[30] ICH.**

Impuretés : Directive sur les solvants résiduels.

*Ligne directive à l'intention de l'industrie pharmaceutique, Hiver 1999.*

**[31] ICH.**

Présence d'impuretés dans les nouveaux produits.

*Ligne directive à l'intention de l'industrie pharmaceutique, janvier 2004.*

**[32] ICH.**

Stability Testing of New Drug Substances and Products.

*ICH Q1A (R2) Guideline, 2003, 16-30.*

**[33] ICH.**

Validation of Analytical Methods, Definitions and Terminology.

*ICH Q2A Guideline, 1996, 68-70.*

**[34] ICH.**

Validation of Analytical Procedures: Methodology.

*Guidance for Industry Q2B, 1996, 10p.*

**[35] INRS.**

Les solvants.

[En ligne]. Disponible sur <http://www.inrs.fr>

Consulté le 30 Janvier 2013.

**[36] INSERM.**

Saturnisme : Quelles stratégies de dépistage chez L'Enfant.

[En ligne]. Disponible sur [http://www.inserm.fr/thematiques/sante\\_publique/expertises\\_collectives](http://www.inserm.fr/thematiques/sante_publique/expertises_collectives).

Consulté le 30 Janvier 2013.

**[37] JENKE D.**

Application of Ion Chromatography in Pharmaceutical and Drug Analysis.

*J Chromatogr Sci, 2011, 47, 540-544.*

**[38] KIRKIACHARIAN S.**

Chiralité et médicaments.

*Techniques de l'ingénieur, (p3340), 16 p.*

**[39] LABORIE S.**

Protecting solutions of parenteral nutrition from peroxidation.

*J Parent Enter Nutr, 1999, 23, 104-108.*

**[40] LE HIR A.**

Pharmacie galénique : les bonnes pratiques de fabrication.

*8ed., Masson, 2001, 237-394, 401p.*

**[41] LEHUCHER M.M.P., LESGARDS J.F., DELUBAC O., STOCKER P., DURAND P., PROST M.**

Stress oxydant et pathologies humaines.

*Press Med, 2001, 30, 1076-1081.*

**[42] LEWEN N., SCHENKENBERGER M., LARKIN T., CONDER S., BRITTAIN H.**

The determination of palladium in fosinopril sodium (monopril) by ICP-MS.

*J Pharm Biomed Anal, 1995, 13, 879-883.*

**[43] MAGGON K.K., MECHKOVSI A.**

Total quality management.

*Drug News Perspect, 1992, 5, 261-270.*

**[44] MARK D.A., PARL K.O., BERNARD A.O.**

Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances.

*Advanced drug delivery reviews, 2007, 59, 12-28.*

**[45] MIN L.K.**

Low-level mercury can Enhance Procoagulant Activity of Erythrocytes: A new factor Mercury-Related Thrombotic Disease.

*Environmental Health Perspectives, 2010.*

**[46] MIQUEL M.G.**

Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé.

*Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques du document N° 2979 de l'assemblée nationale et N° 261 du Sénat, 2001.*

**[47] NICOLAS M., THOMAS T.**

Chromatographie en Phase Gazeuse,

*Licence IUP SIAL, Université de Créteil-Paris XII, 2004.*

**[48] OCKENFELS H., KOHLER F.**

Das L-Isomere als teratogenes Prinzip der N-Phthalyl-DL-glutaminsäure.

*Experientia, 1970, 261, p.236.*

**[49] OMAYMA A.R., AZZA A.G., WAHB A.M.**

Polarographic determination of phenytoin and benzophenone (as impurity) in pharmaceutical preparations.

*J Pharmaceutical Biomedical Anal, 2002, 28 613-619*

**[50] OMS.**

Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques.

*Recueil de directives et autres documents, 1998, p.278.*

**[51] PHARMACOPEE FRANÇAISE.**

Les formes pharmaceutiques.

*8ed, 1965, 1801-1822.*

**[52] PIETTRE D.**

Pharmacologie.

*Vuibert, Paris, 2002, 191p. (Théories et Pratiques infirmières)*

**[53] PIOT S.**

Médicament essentiel multisource : Etude de stabilité en conditions réelles.

*Thèse Pharmacie, Université de CLERMONT I, CLERMONT, 1997.*

**[54] PONT E.**

Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique selon la pharmacopée européenne : évolution des connaissances et des méthodes analytiques de contrôle.

*Thèse Pharmacie, Université de Limoges, Limoges(87), 2010.*

**[55] PRASANNA S.J.**

Validation of Capillary Electrophoresis Method for Determination of N-Methylpyrrolidine in Cefepime for Injection.

*J Chromatogr Sci, 2010, 48, 830-834.*

**[56] RAO R.N., KUMAR T.M.V.N.**

An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals.

*J Pharm Biomed Anal, 2007, 43, 1-13.*

**[57] RAO R.N., NAGARAJU V.**

An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs.

*J Pharm Biomed Anal, 2003, 33, 335–377.*

**[58] ROUESSAC F., ROUESSAC A.**

Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes.

*6<sup>e</sup>ed., Dunod, Paris, 2004, 462p.*

**[59] SÄNGER G.C.E., WAHLSTRÖM C., GRÖNINGSSON K., WIDAHL N.**

A chiral capillary electrophoresis method for ropivacaine hydrochloride in pharmaceutical formulations: validation and comparison with chiral liquid chromatography.

*J Pharm Biomed Anal, 1997, 15, 1051-1061.*

**[60] SFSTP**

Critères de qualité : Validation d'une méthode d'analyse.

*[En Ligne]. Disponible sur [www.sfstp.org](http://www.sfstp.org).*

*Consulté le 20 Mars 2013.*

**[61] SMALL H.**

Ion Chromatography.

*Springer, 1989, 276p.*

**[62] SMITH R.J., WEBB M.L.**

Analysis of Drug Impurities.

*Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2007, 82–163.*

**[63] SOVCIKOVA E., URSYNYOVA M., WSOLOVA L.**

Health effects of lead at low exposure levels in children.

*Toxicol Lett, 1996, 88, p.63.*

**[64] STORCA A.L., PELTEA M., BAINLESCU G.E., IIONICA M.**

Determination of cobalt in pharmaceutical products.

*J Pharm Biomed Anal, 2004, 36, 653-656.*

**[65] STØVING C., JENSEN H., GAMMELGAARD B., STÜRUP S.**

Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters.

*J Pharm Biomed Anal, 2013, 84, 209-214*

**[66] SUBRAMANIAN N.H., BABU V.R.S., JEEVAN R.G.,**

**RADHAHRISHAN G.**

Matrix elimination ion chromatography method for trace azide determination in Irbesartan drug.

*J Chromatogr Sci, 2009, 47(7), 529-533.*

**[67] TAVERNA M., LEPORTIER I., MORIN P.**

Electrophorèse capillaire : Principe.

*Techniques de l'ingénieur, (p3365), 11 p.*

**[68] TREFIS.**

Apport de la RMN conventionnelle et de la RMN DOSY à l'analyse de spécialités pharmaceutiques, de leurs génériques et de leurs copies (ciprofloxacine, Prozac®, Floxyfral®, Viagra®, Cialis®).

*Thèse science, Université de Paul-Sabrier, Toulouse, 2007.*

**[69] USP.**

The United States Pharmacopoeial, The United States Pharmacopeia.

*3<sup>th</sup> ed., USP, Rocville, Mayland, 2012.*

**[70] USP.**

United States Pharmacopoeial Convention: The United States Pharmacopoeia 30, the National Formulary 25.

*United States Pharmacopeial, Rockville, MD, USA, 2007.*

**[71] USP.**

United States Pharmacopoeial Convention. USP monograph: Cefepime for injection,

*USP 32 NF27, 2009, p.1833.*

**[72] WALASH M.I., RISK M.S., SHERIBAH Z.A., SALIM M.M.**

Derivative spectrophotometric analysis of benzophenone (as an impurity) in phénytoine.

*Chemistry Central Journal, 2011, 5, 85-95.*

**[73] WANG.L., MARLEY M., JAHANSOUZ H., BAHNK C.**

Determination of content uniformity and distribution Bahnk characteristics of an investigational drug in its tablets dosage form and granule by ICP AES.

*J Pharm Biomed Anal, 2005, 33955-961.*

**[74] WANG T., WALDEN S., EGAN R.**

Development and validation of a general non-digestive method for the determination of palladium in bulk pharmaceutical chemicals and their synthetic intermediates by graphite furnace atomic absorption spectroscopy.

*J Pharm Biomed Anal, 1997, 15, 593-59.*

**[75] WU C.S., JIA Z.X., NING B.M., ZHANG J.L., WU S.**

Separation and identification of moxifloxacin impurities in drug substance by high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.

*Chinese Chemical Letters, 2012, 23, 1185-1188.*

**[76] ZANOWIAK P.**

Pharmaceutical Dosage Forms.

*Encyclopedia of Chemical Technology, 4ed., Wiley, Chichester, 1996, 18, 480-510.*

## ANNEXES

**Tableau I : Solvants de classe I dans les produits à usage pharmaceutique [30]**

<b>Solvant</b>	<b>Limite de concentration (ppm)</b>	<b>Risque</b>
Benzène	2	Carcinogène
Tétrachlorure de carbone	4	Toxique et dangereux pour l'environnement
1,2-Dichloroéthane	5	Toxique
1,1-Dichloroéthène	8	Toxique
1, 1,1-Trichloroéthane	1500	Dangereux pour l'environnement

**Tableau II : Solvants de classe II dans les produits à usage pharmaceutique [30]**

<b>Solvant</b>	<b>EJA (mg/jour)</b>	<b>Limite de concentration (ppm)</b>
Acétonitrile	4,1	410
Chlorobenzène	3,6	360
	0,6	60

Chloroforme		
Cyclohexane	38,8	3880
1,2-Dichloroéthène	18,7	1870
Dichlorométhane	6,0	600
1,2-Diméthoxyéthane	1,0	100
N, N-Diméthylacétamide	10,9	1090
N, N-Diméthylformamide	8,8	880
2-Ethoxyéthanol	1,6	160
Ethylèneglycol	6,2	620
Formamide	2,2	220
Hexane	2,9	290
Méthanol	30,0	300
2-Méthoxyéthanol	0,5	50
	0,5	50

Méthylbutylcétone		
Méthylcyclohexane	11,8	1180
N-	5,3	530
Méthylpyrrolidone		
Nitrométhane	0,5	50
Pyridine	2,0	200
Sulfolane	1,6	160
Tétrahydrofurane	7,2	720
Tétraline	1,0	100
Toluène	8,9	890
1, 1,2-Trichloroéthène	0,8	80
Xylène	21,7	2170
1,4-Dioxane	3,8	380

**Tableau III : Solvants de classe III devant être limités par les BPF ou par d'autres exigences de qualité [30]**

Acide acétique	Ethanol	3-Méthyl-1-butanol
Acétone	Acéate d'éthyle	Méthyléthylcétone
Anisole	Ether éthylique	Méthylisobutylcétone
1-Butanol	Formate d'éthyle	2-Méthyl-1-propanol
2-Butanol	Acide formique	Pentane
Acétate de butyle	Heptane	1-Pentanol
ter-Butylméthyléther	Acéate d'isobutyle	1-Propanol
Cumène	Acéate d'isopropyle	2-Propanol
Diméthylsulfoxyde	Acéate de méthyle	Acéate de propyle

# PERMIS D'IMPRIMER

---

VU

Le Président de Jury

VU

Le Doyen

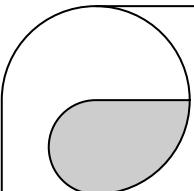
*Vu et Permis d'imprimer*

Le Recteur, Président de l'Assemblée d'Université Cheikh Anta DIOP de DAKAR

et par délégation

**Le Doyen**

***M. Abdarahmane DIA***



## *SERMENT DE GALIEN*

<< Je jure en présence des Maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ;

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque »

