REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Chimie

Spécialité :
Chimie Pharmaceutique

Par :

BOUKHARI Noureddine
KHARARE Abdelhamide

Thème :

Mise au point d'une méthode d'analyse pour le contrôle des impuretés issues de dégradation d'un produit pharmaceutique

Soutenue publiquement le : 04 /06 /2018, Devant le jury composé de :

Yahoum Madiha.M	MCB	U. Médéa	Président
Gasmi Sara Nawel	MCB	U. Médéa	Examinateur
Lefnaoui Sonia	MCA	U. Médéa	Encadreur
Gherdaoui Dahbia	Docteur	U. Médéa	Co- Encadreur

Année universitaire 2017/2018

Louange à ALLAH, Le Tout Puissant, qui m’a aidé à accomplir cet humble travail et à le mener à bon terme.

DÉDICACES

Ce manuscrit de mémoire est dédié :

À mes chers parents,

Je vous remercie pour la confiance inaltérable que vous m'avez accordée.

Merci d'être toujours prêts à me donner sans compter et sans limite.

Merci de m'avoir soutenue, d'avoir cru en moi, de m'avoir transmis l'amour du travail et de m'avoir donné les moyens de parvenir jusqu'ici.

J'espère que j'ai pu vous rendre fiers de moi...

À mes sœurs Hanane et linda, et Imane je vous aime pour toujours.

À mes grands-parents, merci pour votre amour, votre soutien inconditionnel durant mon cursus.

A mon amie Abderaoufe Douifi

REMERCIEMENTS

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance d'accomplir ce travail ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite… Alhamdoulillah.

Nous adressons notre gratitude à l'encadreur de ce mémoire docteur LEFNAOUI Sonia pour la confiance qu'elle nous a accordé, son soutien et ses conseils tout au long de cette recherche.

Un grand merci à notre co-encadreuse Madame Gherdaoui Dahbia , ce travail était d'autant plus agréable grâce à sa gentillesse et ses encouragements.

Nous remercions vivement également mesdames les membres de jury :

Présidente du jury : Docteur YAHOUM Madina Melha

Examinatrice : Docteur GASMI Sara Nawel

Pour l'honneur qu'elles nous ont fait en acceptant de juger notre travail.

Les travaux exposés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire des analyses physico-chimiques Saidale Medea ; nous tenons à présenter nos sincères remerciements à tout le personnel de ces laboratoires pour leur aide sans lesquels ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Finalement, nous exprimons chaleureusement notre profonde gratitude à nos familles qui nous ont toujours soutenu et encouragé. Ainsi que l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation….

« La vérité de demain se nourrit de l'erreur d'hier »

Extrait de Pilote de guerre**, Antoine de Saint-Exupéry**

Table des matières

Liste des figures

Liste des abriviations

Liste des tableaux

Introduction générale

Chapitre 1 la vancomycine

1.1 Définition ……..…….03

1.2. Origine et propriétés physicochimiques ……....03

1.3. Propriétés pharmacocinétiques……...04

1.3.1. Absorption ……....04

1.3.2. Distribution ……..…..05

1.3.3. Elimination :……...05

1.4. Propriétés pharmacodynamiques:……..06

1.4.1. Mécanisme d'action thérapeutique :……....06

1.4.2. PharmacoKinetics/PharmacoDynamics (PK-PD) de la vancomycine..…07

1.5. Posologie et mode d'administration : ……....08

1.6. Propriétés cliniques :……08

1.6.1. Indications thérapeutiques :……....08

1.6.2. Contre-indications :……...09

1.7. Interactions médicamenteuses:……...09

1.7.1. Interactions souhaitées :……09

1.7.2. Interactions indésirables :…….....10

Chapitre 2 la dégradation d'une substance pharmaceutique

2.1 Définition de la stabilité……....11

2.2 Stabilité physique……..12

2.2.1 Examen visuel…….....12

2.2.2 Examen subvisuel……...12

2.3 Stabilité chimique : tests généraux……..13

2.3.1 PH……13
2.3.2 Bilan massique……...14
2.3.3 Perte d'eau par évaporation…….....14
2.3.4 Os molalité……..14
2.3.5 Stabilité chimique ……14
2.4 La dégradation forcée……...15
2.4.1 Historique…….....15
2.4.2 Intérêt de l'étude de la dégradation forcée……...17
1. **Développement de la méthode d'analyse……18**
2. **Développement du conditionnement……...18**
3. **Détermination de la durée de vie et des conditions de stockage…...18**
4. **Maîtrise de la formulation……18**
5. **Evaluation de la toxicité……..18**

Etude de pharmacocinétique…….……...19
Impact sur l'environnement…….....19

2.4.3 La dégradation thermolytique :……19
2.4.4 La dégradation hydrolytique ……20
2.4.5 La dégradation oxydante :…….....22
Le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde organique :……..22
2.4.5 La dégradation photolytique ……...23
Option 1 ……...……...23
Option 2 ……...……...23
2.4.6 Les conditions opératoires…….…25
3.Introduction ……..27
3.1 Les impuretés ……27
Impuretés organiques…….....27
Substances apparentées…….……...28
Isomères…….……...28
Impuretés inorganiques…….……..…29

Solvants résiduels…….……...30

Cas des fraudes……32

Chapitre 4 parie expérimentale

4.1 Introduction :……34

4.2 Matériels et produits ……..34

4.2.1 Produit chimique utilises ……34

4.2.2 Appareils d'analyse :……...35

4.3 Les outilles analytiques ……..35

4.3.1 Spectrophotométrie UV-visible ……..35

4.4 Préparation des solutions…….36

4.4.1 Mode opératoire :……...36

4.5 Dégradation de la vancomycine par des milieux agressive……..……36

4.5.1 Essai de dégradation de la vancomycine sous condition de milieux acide le HCl 0.1N……37

Mode opératoire …….37

Objectif de neutralisation ……...37

4.5.2 Essaie de dégradation de la vancomycine sous condition de milieux acide le HCl 0.5N……..…...37

Mode opératoire …….37

4.5.3 Essai de dégradation de la vancomycine sous condition de milieux basique le NaOH 0.1N…….....38

4.5.4 Essai de dégradation de la vancomycine sous condition de milieux basique le NaOH 0.5N…….……...38

4.6 Etude de dégradations de la vancomycine à des différentes températures .41

4.6.1Préparation des échantillons……...41

Mode opératoire :……41

Préparation de solution témoin ……..…41

Préparation de l'échantillon :……..…….……..41

Analyse d'échantillon ……....42

4.6.2. Résultat et discussions ……43

4.6.3. Etude de dégradation à T=120°c……43

4.6.4 Résultat et discussion……....43

4.7 La courbe d'étalonnage :……..…….…44

4.8. Conclusion ……...45

Conclusion générale

Références bibliographique

Liste des abriviation

ICH	l'International Conference of Harmonisation
DMSO	Le diméthylsulfoxyde
NMP	*N*-Méthyl-2-pyrrolidone
PH	Potentiel hydrogène
T	Temperature

LISTE DES FIGURES :

Figure	Page
Chapitre 1 La vancomycine	
Figure1.1: Structure chimique de la vancomycine	**04**
Figure 1.2 : Site d'action de la vancomycine sur le polymère (peptidoglycane) dans les parois des cellules bactériennes	**07**
Figure1.3:ASIC=ASC/CMI	**08**
Chapitre 2 la dégradation d'une substance pharmaceutique	
Figure2.1 : Voies courantes d'oxydation des médicaments	**22**
Chapitre 3 parie expérimentale	
Figure4.1 : spectre UV de la vancomycine standard	**39**
Figure4.2 : spectre uv de la vancomycine ou milieux acide HCl 0.5 N et basique NaOH 0.5N	**40**
Figure4.3 : spectre uv de la vancomycine ou milieux acide HCl 0.1N	**40**
Figure4.4 : spectre uv de la vancomycine ou milieux basique NaOH 0.1N	**41**
Figure4.5 : spectre uv de la vancomycine standard	**42**
Figure 4.6 : La courbe détalonnage	**45**

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau Page

Chapitre 1 : la vancomycine.

Tableau1.1: les voies d'administration de la vancomycine 04

Tableau 1.2: Diffusion de la vancomycine dans l'organisme 05

Tableau 1.3: La demi –vie d'élimination de la vancomycine 06

Chapitre 2 : la dégradation d'une substance pharmaceutique.

Tableau2.1 : Co-solvants organiques utilisés dans les études de test de stress 21

Tableau2.2 : Condition operatoires proposees pour letude de degradation du 25
principe actif 31

Tableau2.3 : Condition opératoires proposées pour l'étude de dégradation de 26
produit fini

Chapitre 3 : Etude expérimentale.

Tab 4. 1 Tableau récapitulative des produits utilisé 34

Tableau 3. 2 Tableau de matériel 35

Tableau 4.3 résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons par UV 39

Tableau4.4 mesure de l'absorbance de vancomycine exposé à la chaleur T=80 42

Tableau4.5 mesure de l'absorbance de vancomycine exposé à la chaleur T=120 43

Tableau4.6 l'absorbance de défibrant concentration de la vancomycine 44

ملخص

يقدم هذا العمل دراسة للبحث عن شروط تدهور مضاد حيوي الفانكوميسن حيث توصلنا إلي أن هذا الأخير يفقد مقاومته في الأوساط القاعدية المركزة وكذا الأوساط الحامضية المركزة مقارنة بالأقل تركيزا. اما بالنسبة لدرجات الحرارة فان الفانكوميسن يبدي مقاومة عند الدرجة 80 المؤوية و بالنسبة للدرجة 120 مؤوية فنجد أن المضاد الحيوي يفقد مقاومته بنسبة كبيرعند الساعة الخامسة من التعريض. كل النتائج المتحصل عليها اعتمدت مبدئيا علي الأشعة الفوق البنفسجية والمقارنة الدورية مع المحلول الام.

الكلمات المفتاحية: الفانكوميسن , التدهور القسري , الشوائب الصيدلانية, الأشعة الفوق بنفسجية

Résumé

ce travail présente une étude visant à étudier les conditions de la dégradation dun antibiotique la vancomycine, où nous avons constaté que cette dernière perd sa résistance dans les milieux basaux concentrés ainsi que dans les milieux acides concentrés par rapport aux milieux moins concentrés. En ce qui concerne la température, la Vancomysine présente une résistance au niveau de 80 °C et pour le degré de 120°C , l'antibiotique perd sa résistance à un taux élevé à la cinquième heure d'exposition. Tous les résultats obtenus étaient initialement basés sur un rayonnement ultraviolet et une comparaison périodique avec la solution mère.

Mots-clés : Vancomycine ; les impureté pharmaceutique; la dégradation forcée; rayonnement ultraviolet

Abstract :

this work presents a study to investigate the conditions of vancomycin degradation, where we found that the latter loses its resistance in concentrated basal media as well concentrated acidic media compared to less concentrated. As for the temperature, the Vancomysin shows resistance at the 80°C percentile and for the degree of 120°C the antibiotic is found to lose its resistance at a great rate at the fifth hour of exposure. All the obtained results were initially based on ultraviolet radiation and periodic comparison with the mother solution.

Keywords: Vancomycin;pharmaceutical impurity; forced degradation; ultraviolet radiation

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Le terme substance active, ou principe actif, désigne la substance chimique qui, dans un médicament (entendu comme produit pharmaceutique), possède un effet thérapeutique.

Le terme médicament peut être aussi utilisé, par métonymie, pour désigner la substance active. Cependant, une substance active, en soi, peut être bénéfique ou nocive. Tout l'art de la pharmacologie est de sélectionner les substances actives bénéfiques et de déterminer les doses appropriées.

Le principe actif est généralement en très faible proportion par rapport aux excipients. Cela peut être une substance pure dont on connaît la structure chimique et qui est obtenue par des méthodes de synthèse chimique (que l'on désigne aussi par le terme « molécule » dans la mesure où ce qui est alors mis de l'avant est, précisément, sa structure) ou un mélange de plusieurs substances chimiquement proches (isomères, par exemple) ou encore une substance définie par son mode d'obtention (sens original de principe actif, c'est-à-dire ce qui est actif dans un mélange : par exemple, l'acide salicylique est un principe actif extrait de la feuille du saule Salix alba).

Malheureusement ces principes actifs peut dégradés et Les données de leurs stabilité, sont des informations indispensables pour éviter les effets secondaires du a couse de la consommation du produit dégradé.

Tous les médicaments doivent avoir une notice de condition de stockage et d'utilisation et les différentes interactions avec les autres substances chimiques

Le but de ce présent travail est de déterminer les conditions de dégradation d'une substance active « La vancomycine »,

puis la substance actif va exposer à des milieu agressifs tel que les milieux acides , basiques et chaudes , et les analyses vont refaire pour évaluer l'influence de ces milieux sur la substance .

Ce mémoire est divisé en deux grandes parties :

Une partie bibliographique exposée en quatre chapitres :

- le premier chapitre, une introduction sur la substance active étudiée « la vancomycine et sa propriétés, Dans le deuxième chapitre, traitant des généralités sur la dégradation des substances pharmaceutiques.en suite le chapitre des impuretés pharmaceutiques
- Une partie expérimentale, où sont présentés le matériel et les techniques d'analyses ainsi que les méthodes de caractérisation adoptées avec l'ensemble des résultats interprétés.

Enfin, ce présent travail est clôturé par une conclusion générale résumant l'essentiel des résultats.

Chapitre 1 :

LA VANCOMYCINE

1.1 Définition

La **vancomycine** est un antibiotique de la famille des glycopeptides. Volumineuse (1 500 à 2 000 daltons) et complexe, cette molécule est, au même titre que les β-lactamines, une inhibitrice de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne (c'est-à-dire qu'elle tue la bactérie en l'empêchant de construire son enveloppe). Cependant, du fait de son poids élevé, elle ne peut emprunter les pores (porines) de la membrane externe des bactéries Gram négatifs. Son spectre d'action est donc limité aux Gram positifs. La vancomycine est bactéricide, mais cette bactéricidie est lente à apparaître ; sa biodisponibilité par voie orale est négligeable, la voie intraveineuse s'impose donc dans toutes les indications sauf une, le traitement per os (par voie orale) de la colite pseudomembraneuse.

Les principaux effets secondaires sont une atteinte rénale et auditive, il est donc justifié d'entreprendre une surveillance régulière des taux plasmatiques de vancomycine. Enfin, son coût n'est pas négligeable et elle est souvent un traitement de dernier recours. Après l'apparition de nombreux cas d'antibiorésistance, une variante vancomycine 2.0., puis vancomycine 3.0. (2017) ont été mises au point. La version n°3 associe 3 propriétés antibiotiques différentes dans la même molécule, ce qui devrait rendre plus difficile l'apparition de résistances chez les bactéries. En 2017, elle est annoncée par le fabricant comme étant 25 000 fois plus puissante que la précédente. [1]

1.2. Origine et propriétés physicochimiques :

La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides, elle a été découverte en 1956 par *Eli Lilly* à partir d'une culture de *Streptomyces Orientalis.* Cette culture de bactéries a été obtenue à partir d'un échantillon de terre de la jungle de Bornéo. Le produit naturel purifié a montré des propriétés létales contre de nombreuses souches de bactéries Gram-positives et a été nommé **« Vancomycine »** de l'anglais « to vanquish » qui signifie **vaincre [2]**

La vancomycine ($C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$, PM 1485,73 Da) est un glycopeptide tricyclique dichloré possédant une chaîne heptapeptidique comportant cinq cycles aromatiques (partie active de la molécule), à laquelle est fixé un disaccharide composé de glucose et de vancosamine [3]

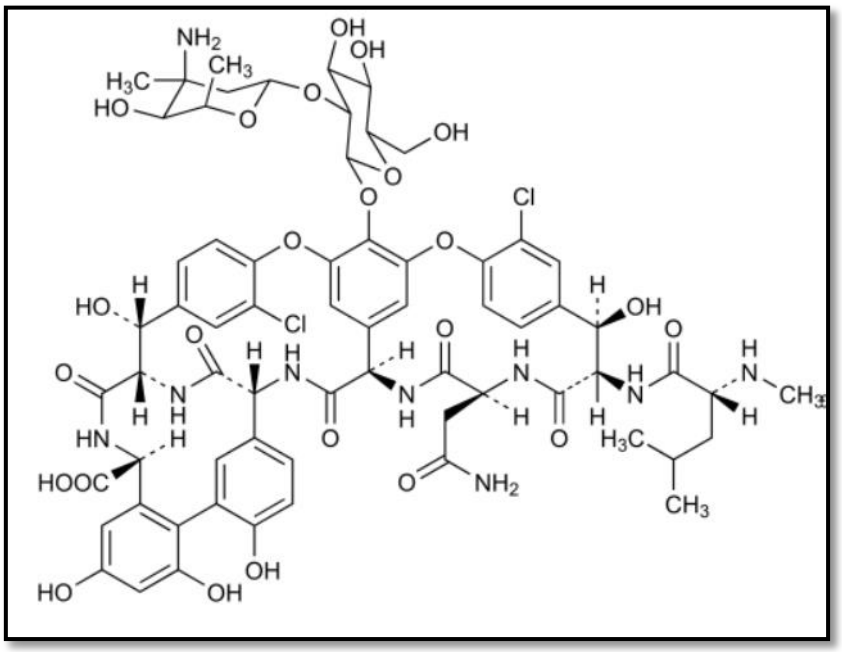


Figure1.1: Structure chimique de la vancomycine [4]

La vancomycine est présente sous une poudre blanche, hygroscopique, facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool. Elle a 6 pKa (2,18 -7,75- 8,89 - 9,59 -10,4-12). Son activité est maximale en pH alcalin. A température élevée : le chlorhydrate de vancomycine se transforme en un produit de dégradation sans activité antibactérienne appelé CDP-1 (vancomycin Crystallin Dégradation Product) [5].

1.3. Propriétés pharmacocinétiques:

1.3.1. Absorption :

Après administration orale, la vancomycine n'est que très faiblement absorbée. Elle est administrée par voie intraveineuse pour le traitement des infections systémiques.
La solution à un pH 3.5 ce qui exclut l'administration intramusculaire. (Meley, 2000)
La vancomycine est le glycopeptide à privilégier en première intention pour un traitement hospitalier [6].

Tableau 1.1 : les voies d'administration de la vancomycine [6].

Absorption digestive	**Négligeable**
Voie i.v directe	0
Voie i.m	0
Vois s.c	0
Perfusion	+

i.v : intraveineuse **; i.m** : intramusculaire **; s.c** : sous-cutanée

Environ 60% d'une dose intrapéritonéale de vancomycine administrée pendant une dialyse péritonéale passent dans la circulation sanguine en 6 heures.

Après administration orale de doses répétées, des concentrations sériques non négligeables ont été observées chez quelques patients traités pour une colite pseudomembraneuse active induite par Clostridium difficile.

1.3.2. Distribution :

Le coefficient de distribution varie entre 0,3 et 0,43 l/kg. Chez l'homme, la liaison de la vancomycine aux protéines plasmatiques est d'environ 55%(mesures réalisées par ultrafiltration à une concentration sérique de 10 mg/l à 100 mg/l).

La vancomycine répond à un modèle pharmacocinétique à trois compartiments : [5].

- Une phase de distribution rapide (t 1/2 = 7 à 15 minutes).
- Une phase de distribution lente avec une demi-vie de 30 minutes à 1 heure.
- Une phase de distribution lente avec une demi-vie de 6 à 8 heures.

Tableau 1.2: Diffusion de la vancomycine dans l'organisme [7]

	LCR	Urine	Bile	Os	Poumons
Vancomycine	+	++	+	+	++
+ : diffusion moyenne ; ++ : diffusion bonne					

La vancomycine ne diffuse pas réellement à travers les méninges normales vers le liquide céphalorachidien, mais lorsque les méninges sont inflammées, la vancomycine diffuse par contre dans le LCR.

1.3.3. Elimination :

La demi-vie d'élimination plasmatique de la vancomycine est de 4 à 6 heures chez les sujets à fonction rénale normale. Au cours des 24 premières heures, environ 75% de la dose administrée sont éliminés dans l'urine par filtration glomérulaire.

La clairance plasmatique moyenne est d'environ 0,058 L/kg/heure et la clairance rénale moyenne est d'environ 0,048 L/kg/heure.

La vancomycine n'est apparemment pas métabolisée.

Bien que la vancomycine ne soit pas éliminée par l'hémodialyse ni la dialyse péritonéale, il y a eu quelques rapports faisant état d'une amélioration de la clairance de la vancomycine lors d'hémoperfusion et hémofiltration.

Tableau 1.3: La demi –vie d'élimination de la vancomycine [8]

Pour :	**La demi-vie (heure)**
Prématuré	*10*
Nouveau-né	*7*
Nourrisson	*4*
Enfant	*2-3*
Adolescent-Adulte	*5-8*

1.4. Propriétés pharmacodynamiques:

1.4.1. Mécanisme d'action thérapeutique :

L'activité bactéricide de la vancomycine repose en premier lieu sur une inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire. En outre, la vancomycine affecte la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne, tout en bloquant également la synthèse de l'ARN.

Cette bactéricidie est temps-dépendante c'est-à-dire que l'effet bactéricide dépend du temps d'exposition pendant lequel la concentration est supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) [9].

Cet antibiotique inhibe la synthèse du composant essentiel de la paroi, le peptidoglycane, en se liant à son précurseur. La liaison est due à l'affinité de la vancomycine pour l'acide aminé terminal du précurseur, la D-alanine.

Le branchement du précurseur au peptidoglycane en cours d'élongation par les enzymes transpeptidases et transglycosylases est ainsi rendu impossible.

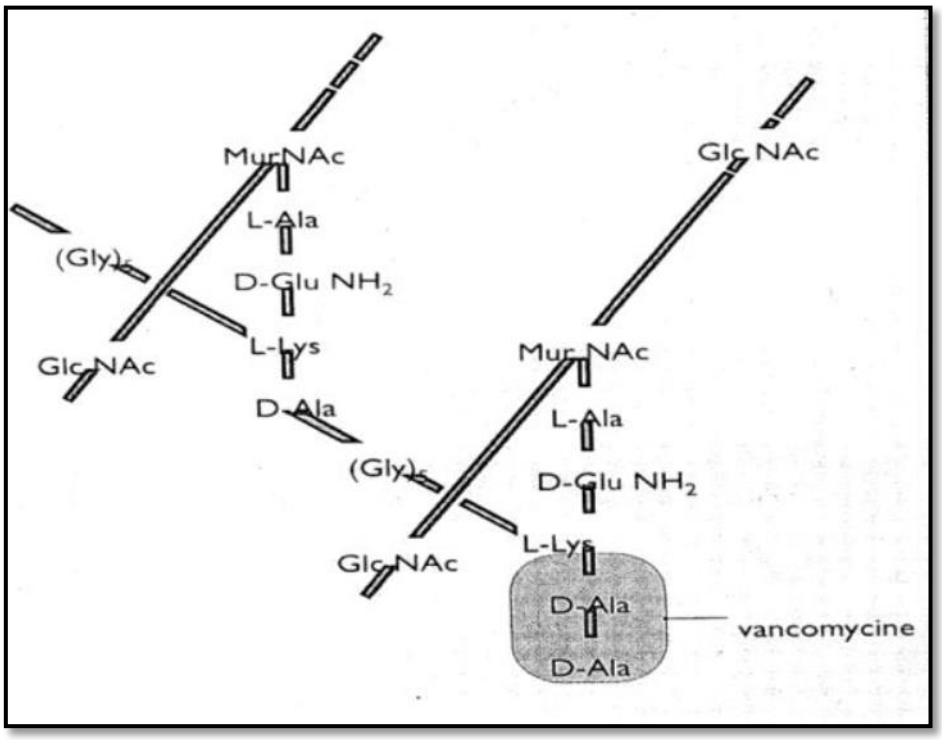


Figure 1.2 : Site d'action de la vancomycine sur le polymère (peptidoglycane) dans les parois des cellules bactériennes

1.4.2. PharmacoKinetics/PharmacoDynamics (PK-PD) de la vancomycine :

ASIC (AUIC des Anglo-Saxons) : Il s'agit du rapport de l'aire sous la courbe des concentrations sériques, calculée sur 24 h, divisée par la CMI. Meilleur paramètre prédictif de l'efficacité clinique.

- ASC24h/CMI > 350 associée avec succès clinique.
- ASC24h/CMI> 400 avec une éradication bactérienne plus rapide chez les patients ayant une pneumonie à *Staphylococcus aureus.*
- ASC24h /CMI ≥250 pour prévenir l'émergence de mutants R.

ASC24 h proportionnelle à la dose quotidienne totale de vancomycine et inversement proportionnelle à la clairance de la créatinine (ClCr), indépendamment d'une administration continue ou intermittente.

Si taux de 25-30 mg/l = AUC/CMI de 600 à 700 : toxicité rénale. [10] ; [11]

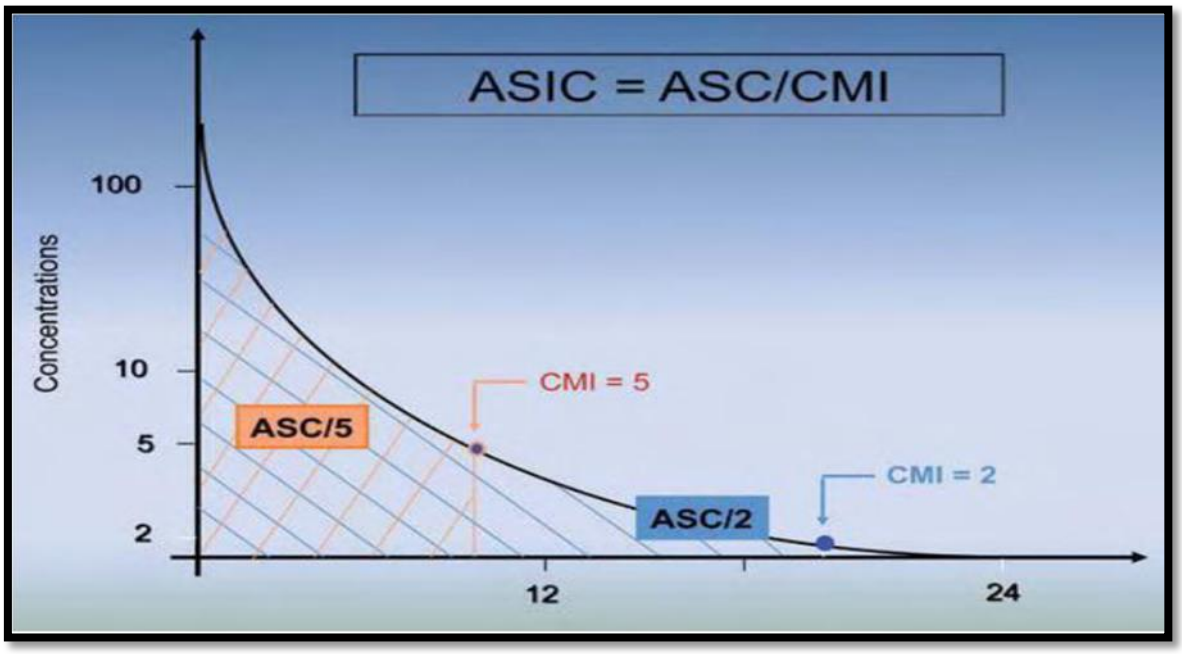


Figure 1.3 : ASIC=ASC/CMI [12]

La surface sous la courbe à considérer pour le calcul est celle obtenue par les concentrations **supérieures à la CMI**. Dans le cas présenté, il s'agit d'une seule administration par 24 h. Le principe du calcul reste le même pour 2, 3, ou plusadministrations par 24 h.

1.5. Posologie et mode d'administration :

Le mode d'administration à préférer est la perfusion intermittente.

Il peut se produire des effets secondaires liés à la perfusion. Ils sont liés à la concentration et à la vitesse de perfusion.

1.6. Propriétés cliniques :

1.6.1. Indications thérapeutiques :

La vancomycine est indiquée en cas d'infections graves dues à des *staphylocoques* résistants à la méticilline. Elle est aussi indiquée en cas d'infections staphylococciques sévères chez des patients allergiques à la pénicilline ou chez des patients qui n'ont pas répondu à un traitement par pénicillines ou par céphalosporines.

En cas d'allergie à la pénicilline, la vancomycine est efficace, seule ou combinée à un aminoside, en cas d'endocardite à *S. viridans* ou *S. bovis.*

En cas d'endocardite à entérocoques (par ex., S. faecalis), la vancomycine n'est efficace que si elle est combinée à un aminoside.

La vancomycine s'est avérée efficace dans le traitement de l'endocardite à staphylocoques et l'endocardite à diphtéroïdes. Son efficacité a également été documentée dans d'autres infections: septicémie, infections osseuses, infections des voies respiratoires inférieures, de la peau et des tissus mous.

En cas d'infections staphylococciques localisées et purulentes, la vancomycine peut être utilisée comme adjuvant à un traitement chirurgical adéquat.

La vancomycine est utilisée en combinaison avec la rifampicine, un aminoglycoside ou les deux pour le traitement de l'endocardite à S. epidermidis ou à diphtéroïdes survenant peu après une prothèse valvulaire.

Bien qu'aucune étude clinique n'ait été réalisée, la vancomycine a été proposée par l'American Heart Association et l'American Dental Association comme prophylaxie de l'endocardite bactérienne chez les patients allergiques à la pénicilline ou chez les patients atteints d'une valvulopathie congénitale, rhumatismale ou autre.

La vancomycine peut être administrée seule ou en association avec l'érythromycine lorsque ces patients doivent subir une intervention dentaire ou chirurgicale au niveau des voies respiratoires supérieures.

La forme parentérale peut être administrée par voie orale pour le traitement de l'entérocolite staphylococcique et de la colite pseudomembraneuse à C. difficile, associée à un traitement antibiotique.

La vancomycine orale n'est pas efficace pour le traitement d'autres types d'infections.

1.6.2. Contre-indications :

La vancomycine est contre-indiquée chez les patients présentant une hypersensibilité connue à cet antibiotique.

1.7. Interactions médicamenteuses:

1.7.1. Interactions souhaitées :

La combinaison de vancomycine et d'un aminoglycoside agit de manière synergique sur de souches nombreuses de S. aureus, de streptocoques et de Streptococcus sp (groupe viridans).

La combinaison de vancomycine et de rifampicine agit de manière partiellement synergique sur certaines souches de S. aureus et de manière synergique sur

S. epidermidis.

Un test de synergie est utile parce que la combinaison de vancomycine et d'une céphalosporine peut avoir un effet antagoniste sur certaines souches de

S. epidermidis; la combinaison de vancomycine et de rifampicine peut avoir un effet antagoniste sur certaines souches de S. aureus.

La vancomycine est efficace, seule ou combinée à un aminoside, en cas d'endocardite à S. viridans ou à S. bovis. En cas d'endocardite à entérocoque (par ex., S. faecalis), la vancomycine ne sera efficace qu'en association avec un aminoglycoside.

1.7.2. Interactions indésirables :

La vancomycine en solution à un faible pH qui peut provoquer une instabilité physique d'autres substances. Les produits médicamenteux à usage parentéral doivent être inspectés visuellement avant l'administration, lorsque la solution ou le récipient le permettent, pour voir s'il n'y a rien de particulier tel qu'une modification de coloration.

Chapitre 2 :

LA DEGRADATION D'UNE SUBSTANCE PHARMACETIQUE

2.1 Définition de la stabilité

Il existe plusieurs définitions pour la stabilité d'un médicament.

Dans un dictionnaire classique comme le Larousse®, la stabilité est définie comme « la permanence d'une espèce chimique » ou encore comme « la propriété d'un corps ou d'un système qui est dans son état d'équilibre ». [13] Ces définitions sont bien évidemment trop imprécises pour décrire le cas d'un médicament.

Une autre définition parfois employée décrit la stabilité comme « le temps pendant lequel le médicament conserve son intégrité sur les plans qualitatif et quantitatif » [14]. En fonction du temps, et parfois d'autres facteurs comme la température, la lumière ou la concentration de la solution, on peut constater une diminution de la teneur de la substance active ou l'apparition de produits de dégradation (PD). Parfois même, il arrive qu'une solution ou une suspension contienne des PD dès les premiers instants de sa préparation. C'est le cas des suspensions d'azacitidine (Vidaza®), pour lequel des PD peuvent être mis en évidence à T0, ceci s'expliquant par l'hydrolyse facile de

L'azacitidine en dérivé formylé [15-16]. Si ces phénomènes se déroulent dans des limites spécifiées, le médicament peut être considéré comme stable. L'intégrité n'est donc pas appropriée pour définir la stabilité et cette définition s'avère fausse pour les médicaments.

Dans les publications internationales, on retrouve très fréquemment « la stabilité définie comme le maintien d'au moins de 90% de la concentration initiale en solution ». La notion de concentration en substance active exprimée en pourcentage de la concentration initiale constitue effectivement une approche de la stabilité. Cette définition est toutefois incomplète car ne tient pas compte des éventuelles impuretés et/ou PD. De plus, les anticancéreux sont des médicaments à marge thérapeutique étroite, dont l'efficacité comme la toxicité sont fortement doses-dépendantes. Bien qu'applicable pour la plupart des classes pharmacologiques, cette valeur de 90% est discutable pour le cas des anticancéreux.

Les recommandations établies par l'International Conference of Harmonisation (ICH) figurant dans l'ICH Q1A(R2) [17] définissent la stabilité comme « The ability of an active ingredient or a drug product to retain its properties within specified limits throughout its shelf-life. The chemical, physical, microbiological and biopharmaceutical aspects of stability must be considered ». Il y est également défini de façon générale ce que représente un changement significatif pour un médicament.

2.2 Stabilité physique

La dégradation d'un médicament ne se décrit pas uniquement par une perte de teneur en substance active, il peut s'agir dans certains cas de changements physiques comme l'apparition ou la modification de la couleur, la formation de précipités ou de cristaux. L'apparence, les caractères organoleptiques, la taille des particules font donc partie intégrante des éléments à examiner pour la détermination de la stabilité.

Pour les solutions destinées à la voie parentérale, les évènements pouvant survenir sont :

- Une décoloration due à des réactions photochimiques ou d'oxydation
- L'apparition d'un précipité
- L'apparition de « *whiskers* »

Au-delà de l'apparence, ces phénomènes peuvent entraîner des changements dans la biodisponibilité de la solution, la pharmacocinétique et l'efficacité du traitement.

Pour les suspensions, les changements décrits sont :

- La sédimentation
- L'agglutination («*caking* »)
- L'augmentation de la taille des cristaux

L'ICH cite également le cas de la séparation de phase et de remise en suspension.

Ces phénomènes peuvent parfois être mis en évidence par un simple examen visuel.

2.2.1 Examen visuel

Toutefois, les monographies de la Pharmacopée concernent des matières premières et non des produits finis comme c'est le cas dans les études de stabilité. Ces tests ne sont donc quasiment jamais pratiqués dans les publications. L'examen visuel consiste le plus souvent à analyser à l'oeil nu la solution : couleur, limpidité, recherche de cristaux ou de précipité et fournit des éléments de réponse importants quant à la stabilité physique.

Bien qu'indispensable, cet examen visuel n'est pas suffisant.

2.2.2 Examen subvisuel

La formation de microparticules, d'agrégats, ou de précipités subvisuels peuvent entraîner une perte d'efficacité du traitement mais surtout des risques d'embolie mettant directement le patient en danger. La formation de micro-agrégats est un signe d'instabilité de la solution qui peut précipiter plus tard ou dans la tubulure de perfusion.

La conférence de consensus européenne recommande un examen subvisuel plus systématique, basé sur la turbidimétrie pour toutes les études de stabilité de

médicaments anticancéreux en solution lorsque les autres méthodes comme l'obstruction de la lumière ne sont pas possible [18].

2.3 Stabilité chimique : tests généraux

Les principales réactions de dégradation chimique en cause sont :

- L'hydrolyse

L'hydrolyse est le mécanisme de dégradation le plus commun. Elle survient essentiellement si la molécule est un dérivé d'acide carboxylique comme un ester, un amide, une lactone, un lactame, un imide ou un carbamate. Elle dépend du pH et de la force ionique. L'hydrolyse est une réaction lente mais en milieu acide (catalyse acide) ou alcalin (catalyse basique), la vitesse de réaction augmente et des décompositions significatives peuvent apparaître.

- L'oxydation : elle est la cause majeure de dégradation des médicaments contenant un groupement phénolique, un sulfure, un éther, un thiol, un aldéhyde, ou des insaturations.

C'est également le cas des amines aromatiques et aliphatiques. Les ions métalliques peuvent favoriser ces réactions d'oxydation.

- Autres réactions : isomérisation, épimérisation, polymérisation, photolyse.

Ces différentes réactions chimiques conduisent à une dégradation de la molécule, c'est-à-dire à une diminution de la teneur en substance active et en parallèle, une apparition ou une augmentation de la teneur en PD. Les techniques citées précédemment, notamment la HPLC vont permettre de séparer ces constituants pour ensuite les doser et suivre leur évolution en fonction du temps.

D'autres tests plus généraux permettent également d'obtenir des informations relatives à la stabilité chimique.

2.3.1 PH

La variation de pH est un test simple et classique, indiquant une éventuelle instabilité chimique.

Selon l'ICH , "Acceptance criteria for pH should be provided where applicable and the proposed range justified" [19]. Dans cette recommandation, aucune variation maximale n'est spécifiée. Les variations de pH ne s'interprètent donc pas facilement et il faut garder à l'esprit que le pH est une échelle logarithmique :

$$pH = - \log [H_3O+] \text{ et } [H_3O+] = 10^{-pH}$$

Ainsi une diminution d'une unité de pH correspond à une multiplication par 10 de la concentration en protons.

2.3.2 Bilan massique

La loi de conservation de la matière, ou principe de masse, s'applique pour toute réaction chimique se produisant dans un système clos comme une seringue ou une poche contenant une préparation de médicament anticancéreux : la masse des produits est égale à la masse des réactifs.

Ainsi en CLHP, la surface du pic du médicament à l'étude à T0 équivaut à la somme des surfaces des pics du médicament et de ses PD à la fin de l'étude, à conditions qu'ils possèdent tous des chromophores.

2.3.3 Perte d'eau par évaporation

Pour les solutions conditionnées en poches en PVC, une évaporation peut avoir lieu à travers la paroi, entraînant une augmentation de la concentration des substances en solutions. Une augmentation de la concentration en substance active passant par exemple de 100% à 115% accompagnée d'une perte de masse est les résultats typiquement obtenus dans ce cas.

2.3.4 Os molalité

L'os molalité représente le nombre de particules osmotiquement actives par kilogramme d'eau.

Une variation d'os molalité peut correspondre à l'apparition de nouvelles entités chimiques dans la solution, et donc probablement de PD.

2.3.5 Stabilité chimique

* Chromatographie liquide à haute performance

L'emploi d'une méthode séparative est essentiel pour déterminer la stabilité chimique d'une préparation, dont la technique de choix est la CLHP.

La technique choisie doit absolument permettre de séparer la substance principale de ses PD et des autres impuretés. On parle de méthode indicatrice de stabilité ou encore de "Stability-indicating assay methods" (SIAMS).

2.4 La dégradation forcée

L'étude de la dégradation forcée consiste à imposer au produit certaines conditions de stress plus drastiques que celles employées lors des études de stabilité à long terme ou accélérées, telles que *la température, l'humidité, le pH, la lumière et l'oxydation.*
L'objectif de l'étude de la dégradation forcée est d'obtenir le maximum de dégradation en générant des impuretés potentielles, sans toutefois entraîner les processus de dégradation secondaire, Ce qui permettra de développer une méthode de recherche de ces produits de dégradation ainsi formés **[20]**.

2.4.1 Historique

En industrie pharmaceutique, les termes ''test de stress'' et ''test de stabilité accéléré'' sont souvent utilisés dans la stabilité du médicament et la prévision de sa durée de vie **[21]**. *Kennon et al.* **[22]** ont montré l'effet de la température élevée (jusqu'a
85° C) sur les taux de dégradation de produits pharmaceutiques ce qui permet de prévoir la durée de vie du produit.
Puis, *Yang* **[23]** et *Witthaus* **[24]** et leurs collaborateurs ont démontré que
3 mois à 40°C et 75% d'humidité relative est à peu près l'équivalent de 24 mois
à température ambiante. Ces conditions ont été alors adoptées par la FDA (Food and Drug Administration) des USA.
Connu historiquement sous le nom de « rule of thumb », le travail de
Carstensen **[21]** montre que 5 semaines de stockage à 42°C sont équivalentes à
2 ans de conservation à température ambiante.
Singh et Bakshi **[25]** ont montré que les conditions de stress acide et basique peuvent être très variables engendrant des taux de dégradation également très variables :

- HCl 0.1N à 40°C pendant une semaine (avec une dégradation négligeable),
- HCl 0.1N à 65°C pendant 21 jours (71.6% de dégradation)
- HCl 0.1N à 105°C pendant 2 mois (dégradation considérable)
- HCl 4N pendant 2 jours (66% dégradation)
- HCl 6.5N à 108°C pendant 24 heures (50% dégradation)
- HCl concentré à température ambiante (56.5% dégradation)
- NaOH 0.1N à 40°C pendant une semaine (dégradation négligeable)
- NaOH 0.1N à 65°C pendant 21 jours (100% de dégradation)
- NaOH 0.1N pendant 2 jours (68% de dégradation)

- NaOH 1N pendant 3 jours (7.2% de dégradation)
- NaOH 5N pendant 4 heures (100% de dégradation)

Les études de dégradation par l'oxydation au peroxyde d'hydrogène à une concentration variable de 0.3% à 30% à température élevée ont été souvent effectuées. Par exemple, 3% de peroxyde à 37°C pour 6h (60% de dégradation),
3% de peroxyde à 50°C pour 72h (6.6% de dégradation), ou peroxyde 10% pour
6h donne une (dégradation non significative).

Ainsi, *Singh et Bakshi* ont remarqué qu'il existe une variation considérable en ce qui concerne les conditions de stress. En effet, il est indispensable de déterminer la durée de l'exposition, le taux de dégradation et la température suffisante pour mettre fin à l'exposition au stress. Ils ont constaté également que les conditions du test de stress varient considérablement d'un composé à un autre.

En 1992, *Boccardi* **[26]** a indiqué que la plupart des produits pharmaceutiques subissent une auto-oxydation et que le peroxyde d'hydrogène H2O2 n'est pas un très bon réactif pour imiter ce processus.

BOCCARDI était le premier qui a décrit l'utilisation d'un radical initiateur : l'Azobis-IsoButyroNitrile (AIBN) pour le test de stress par l'oxydation.

En 1998, *Weiser* **[27]** a démontré le rôle du test de stress dans le développement de la méthode analytique. C'est ainsi qu'il a proposé une série de conditions pour la réalisation des tests de stress.

En 2000, *Singh et Bakshi* **[28]** décrivent un système de classification des composés selon leur sensibilité aux conditions de stress (Extrêmement labile, très labile, labile, stable).

En 2001, *Alsante et al*. **[29]** ont suggéré la définition des limites des conditions de stress. A titre d'exemple, il est proposé d'utiliser une solution d'acide chlorhydrique HCl 1N et basique de NaOH 1N pour une semaine au maximum à température ambiante.

En 2002, l'association des fabricants et de recherche pharmaceutique
PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturer's Association) précise les différents types de stress qui devraient être effectués sur les médicaments lors de l'étude de la dégradation forcée **[30]**.

Des publications récentes des études de dégradation forcée révèlent qu'il existe une énorme variété dans les conditions employées, par conséquent, la dégradation forcée n'a pas un protocole général et bien précis pour sa réalisation. **[31]**

2.4.2 Intérêt de l'étude de la dégradation forcée

L'étude de la dégradation forcée d'une molécule active constitue le principal outil utilisé pour prévoir les problèmes relatifs à sa stabilité.

L'évaluation de la stabilité d'une molécule nécessite le développement d'une méthode analytique appropriée (sélective et sensible).

En effet, la stabilité de la molécule active peut avoir une influence sur différents paramètres lors de la formulation du médicament. Il est donc important d'avoir recours à ces études pour une optimisation de la formulation galénique. Par ailleurs, les données relatives à la stabilité permettent de préciser la nature du conditionnement qu'il convient d'utiliser et de déterminer les conditions de stockage appropriées et la durée de vie.

Les études de dégradation forcée permettent également de prévoir le devenir du médicament au niveau de l'organisme (données de la pharmacocinétique) mais aussi dans l'environnement. En outre, ces études permettent aussi l'évaluation de la toxicité de la molécule.

1. **Développement de la méthode d'analyse**

L'évaluation de la stabilité d'un composé nécessite une méthode analytique appropriée. Pour développer une méthode permettant la détection des produits de dégradation potentiels, il faut avoir recours aux études de dégradation forcée.

2. **Développement du conditionnement**

Les informations acquises à partir de l'étude de la dégradation forcée seront utilisées pour le choix d'un conditionnement approprié. Elles permettent de déterminer la sensibilité du composé à l'hydrolyse, l'oxydation, la chaleur et la lumière.

A titre d'exemple, si un composé est sensible à l'hydrolyse, l'emballage doit être conçu de telle sorte qu'il protège la transmission de la vapeur d'eau de l'extérieur vers l'intérieur du conditionnement et qu'il assure une stabilité durant le stockage à long terme.

3. Détermination de la durée de vie et des conditions de stockage

La détermination des conditions de stockage appropriées pour la matière première ou le produit fini nécessite une connaissance des conditions qui induisent la dégradation. La plupart de ces renseignements sont obtenus à partir des études de dégradation forcée combinées aux études de stabilité en temps accéléré. La prévision d'une durée de vie exacte est toutefois la mieux réalisée avec les données des études de stabilité à long terme.

4. Evaluation de la toxicité

Si les études du test de stress indiquent la formation de composés toxiques connus, des mesures doivent être prises dès le début pour éviter la formation de ces composés toxiques et pour développer une méthode analytique sensible pour les détecter et les quantifier d'une manière exacte.

Les études du test de stress peuvent également faciliter la génération et la séparation des produits de dégradation pour l'évaluation toxicologique, puisque la préparation synthétique est presque irréalisable.

5. Maîtrise de la formulation

La dégradation peut se produire également lors de la fabrication. La connaissance des conditions qui conduisent à la dégradation de la substance active peut aider à la conception des contrôles appropriés et des conditions convenables durant la fabrication ; Par exemple, si le composé est sensible à la dégradation à un pH acide et la fabrication nécessite un pH bas, l'utilisation d'un milieu acide sera évitée ou contrôlée plus attentivement pour minimiser la dégradation, tout en observant la dégradation durant la formulation.

Et si la substance s'oxyde facilement, il est impératif d'utiliser un gaz inerte lors de la fabrication.

6. Etude de pharmacocinétique

Avant sa commercialisation, le devenir du médicament dans l'organisme (la pharmacocinétique) fait l'objet de plusieurs études englobant les étapes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination.

Ces études fournissent l'identification des principaux métabolites, ce qui est difficile in vivo.

Dans ce cas, il est généralement plus facile de générer une grande quantité des produits de dégradation grâce au test de stress plutôt que de l'isoler in vivo, puisque ces derniers sont considérés comme des métabolites.

7. Impact sur l'environnement

L'étude de la dégradation forcée d'une substance active permet de prévoir le devenir du médicament qui la contient dans l'environnement. En effet, l'information obtenue à partir du test de stress peut être utilisée pour la conception et l'interprétation de l'étude du médicament dans l'environnement.

D'après cette étude, il est évident que la dégradation du médicament dans l'environnement est souvent similaire à la dégradation observée durant les études du test de stress. **[31]**

2.4.3 La dégradation thermolytique :

Le mot « thermolytique » est utilisé pour décrire des réactions qui sont guidées par la chaleur. La dégradation thermolytique ou pyrolyse correspond à l'exposition à une température élevée, ce qui va provoquer la rupture des liaisons. Son mécanisme peut être considéré comme, hydrolyse, déshydratation, isomérisation, épimérisation, décarboxylation, réarrangement ou quelques types de réactions de polymérisation. **[31]**

La loi d'Arrhenius, énoncée par *Svante August Arrhenius* en 1889, a été utilisée dans le domaine de l'industrie pharmaceutique afin de prévoir le taux de dégradation d'un composé à l'état solide. La relation d'Arrhenius est probablement la plus couramment utilisée pour évaluer l'expression de la relation entre les taux des réactions et la température et pour donner ordre à la réaction **:**

$$(1) \qquad k = A \cdot e^{\frac{-E_\alpha}{R \cdot T}}$$

- K : Coefficient de vitesse, anciennement appelé "constante de vitesse".
- A : Facteur pré-exponentiel (appelé aussi facteur de fréquence) tenant compte de la fréquence des collisions et des effets stériques. Il ne dépend pas de la température.

- Eα : Energie d'activation d'Arrhenius.
- T : Température (en Kelvin).
- R : Constante des gaz parfaits (R = 8,314 472 Pa.m3.K^{-1}.mol^{-1}). **[31,32]**

La loi d'Arrhenius montre que les réactions ayant les énergies d'activation les plus faibles sont les plus rapides et vice versa.

2.4.4 La dégradation hydrolytique

La réaction qui implique le contact avec l'eau est appelée hydrolyse. Cette dernière est affectée par le pH, le tampon, la force ionique, les solvants et d'autres agents tels que les complexants et les excipients. Ainsi, chacun de ces facteurs devra être individuellement examiné.

Les réactions d'hydrolyse sont généralement catalysées par l'acide ou la base. Ceci est particulièrement important lorsque le composé testé présente un groupement fonctionnel ionisable, lui permettant d'exister sous différents états d'ionisation. Cependant, le test de stress par hydrolyse doit s'effectuer sur un seul état de protonation du composé à tester, Il est tout de même inutile d'utiliser des milieux plus acides ou plus basiques car cela va accélérer l'effet catalyseur de la solution utilisée et augmenter le risque d'induire des voies de dégradation irréalistes. **[33]**

Lorsque la solubilité du principe actif impose l'utilisation d'un co-solvant organique, il est nécessaire d'éviter les alcools qui peuvent générer des réactions secondaires (par exemple : trans-estérification dans le cas du méthanol), surtout lorsque la substance contient une fonction acide carboxylique, amide ou ester. En effet, ces fonctions peuvent réagir facilement avec le méthanol. **[34]**

L'acétonitrile est généralement considéré comme un solvant organique inerte. Il est aprotique et compatible avec la plupart des méthodes d'analyse par HPLC. C'est pour cette raison qu'il est préférable au méthanol dans les études du test de stress hydrolytique.

Pour les produits insolubles, il est également possible de réaliser l'étude de dégradation en suspension, dans la mesure où une étape de redilution dans un solvant adapté est prévue pour solubiliser le principe actif avant l'analyse **[35]**.

Si le pH du principe actif mis en solution est loin de la neutralité, il est préférable de rajouter une condition de dégradation en pH tamponné neutre (entre 6 et 8) afin de compter la gamme de pH étudiée.

La température peut être modifiée pour atteindre le niveau de dégradation souhaité. Une température maximale de 60°C est conseillée pour les solutions aqueuses.

Après la phase de dégradation du principe actif en milieu acide ou basique, une étape de neutralisation peut être envisagée afin d'arrêter la réaction et d'éviter ainsi une dégradation excessive. Néanmoins, lors de l'interprétation des résultats, il faudra prendre en compte cette phase de neutralisation.

Au cas où des précipités apparaissent au cours du stress, il sera nécessaire de reprendre la solution dans un milieu organique afin d'analyser le précipité. **[31]**

Tableau2.1 : Co-solvants organiques utilisés dans les études de test de stress.

pH acide	**pH neutre**	**pH basique**
Acétonitrile	Acétonitrile	Acétonitrile
DMSO	NMP	DMSO
Acide acétique		Glyme
Acide propionique		Diglyme
		p-Dioxane

2.4.5 La dégradation oxydante :

L'eau et l'oxygène sont les molécules omniprésentes qui affectent souvent la stabilité d'une substance médicamenteuse. Parfois, il semble difficile de reproduire l'auto-oxydation qui se fait par l'oxygène telle qu'elle est formulée par l'équation (2).

$$(2) \quad RH + ({}^{3}\textstyle\sum_{g}) O_2 \rightarrow ROOH$$

Les agents oxydants qui peuvent être utilisés dans le test de stress sont :

1. Le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde organique :

L'oxydation par le peroxyde est très répandue dans le développement pharmaceutique. Les réactions les plus communes des composés organiques sont les attaques électrophiliques de l'amine et des sulfures pour donner des N-oxydes (Equation 3) et sulfoxydes ou sulfones (Equation 4), respectivement, et une lente attaque de la double liaison carbone-carbone pour donner un époxyde (Equation 5) **[36]**.

Ces réactions sont ioniques et ne fournissent pas des radicaux libres. Ce type d'oxydation donne souvent des impuretés de dégradation qui peuvent être mineures dans la dégradation à long terme. **[37]**

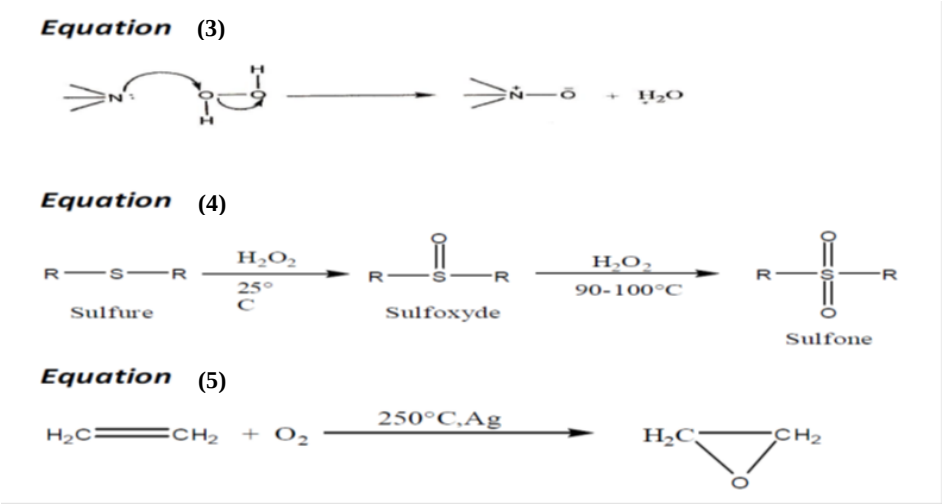


Figure 2.1 : Voies courantes d'oxydation des médicaments

2.4.5 La dégradation photolytique

La dégradation par la lumière résulte de l'exposition à la lumière UVvisible à des longueurs d'ondes situées entre 300 et 800 nm. Le taux de dégradation dépend directement de la quantité du rayonnement incident et de la quantité du rayonnement absorbée par le composé.

Une variété de sources de lumière a été utilisée, en respectant à la fois la longueur d'onde et l'intensité des lampes germicides (presque monochromatique, 254nm) à la lumière solaire (émission de l'extension de

proche-UV à l'IR). D'un point de vue scientifique, tout choix de la source de lumière est correct à condition que la lumière émise soit réellement absorbée.

Les normes ICH (Conférences Internationales d'Harmonisation) décrivent deux options pour les sources de lumière utilisées dans les essais de

photostabilité :

- **Option 1 :** il s'agit de toutes les sources lumineuses donnant un rendement comparable à celui de l'étalon d'émission (D65/ID65) comme, par exemple, une lampe fluorescente donnant une lumière du jour artificielle combinant la lumière visible et

l'ultraviolet (UV), une lampe au xénon ou une lampe aux haloïdes (halogénures métalliques).

Le D65 est l'étalon international de la lumière du jour extérieure défini dans la norme ISO 10977:1993. L'ID65 est l'équivalent de la lumière du jour indirecte intérieure.

Si la source lumineuse émet une partie importante du rayonnement au-dessous de 320nm (UV B, UV C), il faut les éliminer au moyen d'un filtre approprié.

- **Option 2 :** l'échantillon doit être exposé à la fois à une lumière fluorescente blanche et dans l'ultraviolet proche.

Une lampe fluorescente donnant un rendement comparable à celui indiqué dans la norme ISO 10977 (1993) ; et une lampe dans le proche ultraviolet avec distribution spectrale entre 320 nm et 400 nm et une émission d'énergie maximum comprise entre 350 nm et 370 nm.

Du point de vue pratique, il est nécessaire d'utiliser la même lampe dans les deux tests : le test de stress et celui de confirmation. Les ICH décrivent deux types de tests pour la détermination de la photostabilité du médicament : le test de la dégradation forcée et le test de confirmation de la photostabilité.

Conçues par analogie aux études de stabilité accélérée, les épreuves de confirmation servent à déterminer les caractéristiques de photostabilité du produit dans des conditions normalisées. Elles ont pour but de fournir les informations nécessaires pour la manipulation, l'emballage et l'étiquetage.

En effet, elles nous informent sur la nécessité de prendre des précautions particulières dans la fabrication ou dans le choix de la formule, ou d'utiliser un emballage photorésistant et de donner des indications spéciales sur l'étiquette pour réduire le risque d'exposition à la lumière au cas où le médicament est photolabile.

Les études de dégradation forcée, quant à elles, sont conçues pour induire la formation de tous les produits de photo-dégradation qui ont une chance raisonnable d'être formés au cours du test de confirmation. S'il est démontré que les produits de dégradation ne sont pas formés sous les conditions de l'épreuve de confirmation, ces produits ne seront pas examinés par la dégradation forcée par la suite.

Ces études ne sont pas conçues pour établir la relation entre les taux de photo-dégradation et le stockage. Par conséquent, la dose de la lumière utilisée dans le test de confirmation n'est pas suffisante pour le test de stress. C'est pour cette raison que les

ICH recommandent pour les études de dégradation forcée une exposition 5 à 10 fois supérieure à celle utilisée dans les études de confirmation.

En ce qui concerne les études de confirmation, les échantillons doivent être exposés à la lumière visible fournissant un éclairage supérieur à 1,2 millions de lux et une heure de l'ultraviolet proche dont l'énergie est d'au moins 200W.h/m2.

Au cas où on obtient des produits de dégradation au cours du test de confirmation, ils doivent être examinés même s'ils existent à une faible quantité.

La mesure de la dose de la lumière est particulièrement importante dans les études de dégradation forcée. Le flux de la lumière peut être mesuré au moyen d'un produit chimique : actinomètre, c'est-à-dire, à l'aide d'une substance dont le rendement quantique de photo réaction est connu, ou par le biais d'un instrument physique (phototube ou un photomultiplicateur).

Le choix d'un actinomètre chimique convenable dépend de sa sensibilité et de la longueur d'onde de la lumière absorbée. Il faut toutefois étalonner le système actinométrique avec la source lumineuse utilisée. Les ICH proposent la photodégradation de 2% de quinine mono chlorhydrate dihydrate dans l'eau (poids/volume) en tant qu'actinomètre de la lumière UV (300-380nm). **[38]**

2.4.6 Les conditions opératoires

Les conditions opératoires proposées par D. Breton et ses collaborateurs **[30],** dans un article de STP Pharma, pour la dégradation des principes actifs sont résumées dans les tableaux suivants (**Tableau 2** et **Tableau 3**).

Tableau 2.2 : Condition operatoires proposees pour letude de degradation du principe actif

stress	Etat de PA	Conditions types	Condition nement	Condition maximale de stress
chaleur	Tel quel	-minimum : 10°C au-dessus de la condition accélérée ICH -maximum : 20 à 30 °C au-dessous de la température de fusion ou de la transition cristalline abri de la lumière.	Contenant verre hermétique ment fermé	12 jours 80°C
Chaleur + humidité	Tel quel	Au minimum 75% d HR Température conditions retenues pour le stress chaleur Abri lumière	Contenant verre ouvert	12 jours 80°C 95% d HR
Photo-dégradation	Tel quel	1.2 million Lux.h et pas moins de 200 watt.h /m^2	Contant inerte et transparent aux UV	-
Influence de PH	Solution aqueuse ou si nécessaire hydro-organique	PH basique : NaOH 0.1 à 1M PH acide : HCl 0.1 à 1M Température ambiante Abri lumière	Contant étanche et inerte	10 jours molarité $1MT_{max}$ 60°C
Stress oxydant	Solution aqueuse ou si nécessaire hydro-organique	H_2O_2 : à 10% ou autre agent oxydant Température ambiante Abri lumière	Contant étanche et inerte	24h pour concentration 10%

Tableau 2.3 : Condition opératoires proposées pour l'étude de dégradation de produit fini

Stress	Forme pharmaceutique	condition	Conditionnement	Condition maximale de stress
Chaleur	solide	Au minimum 10°C au-dessus de la condition accélérée ICH Abri lumière	Contenant ferme	4 semaines à 60°C (ou 12 jours 80°C)
	Liquide et semi solide		Conditionnement primaire et/ou contenant inerte ferme	4 semaines à 60°C (ou 12 jours 80°C)
Chaleur + humidité	Solide	Au minimum 75% HR température Condition retenues pour le stress chaleur Abri lumière	Contenant ouvert	4 semaines à 60°C (ou 12 jours 80°C) Haut niveau humidité
Photo-dégradation	Solide	Décrites dans ICH Q1B	Contenant inerte transparent aux UV	1.2 million de lux.h et pas moins de 200 watt.h/m^2
	Liquide et semi solide			

Chapitre3 :

LES IMPURETES PHARMACEUTIQUES

3.1 Introduction

Les impuretés sont toujours présentes dans le médicament à l'état de traces, et peuvent en altérer sa qualité, son efficacité et engendrer des effets secondaires. C'est pour cette raison que des exigences réglementaires (pharmacopées **[39-40]**) et des recommandations officielles ICH Q3A Q3B **[41-42]** ont établi des valeurs limites et des seuils pour les impuretés.

3.2 Les impuretés

Une impureté est définie comme un composant de la substance médicamenteuse qui n'est pas l'entité chimique définie comme le principe actif **[43]** L'origine des impuretés dans les principes actifs et les médicaments est de diverses sources qui peuvent être résumées dans les phases du procédé de synthèse, la formulation et la conservation**.** L'analyse des impuretés selon des limites d'acceptation prédéfinies est une exigence pour les autorités de régulations et ces limites sont basées sur la dose quotidienne maximale en principe actif.

Il existe de nombreux types d'impuretés. Celles-ci peuvent être classées en 3 grandes catégories :

- Impuretés organiques
- Impuretés inorganiques
- Solvants résiduels.

En plus de ces trois grandes catégories d'impuretés, nous aborderons le cas des produits frauduleux, leur présence étant de plus en plus démasquée ou suspectée

A. Impuretés organiques

Les impuretés organiques, autres que les solvants, sont principalement composées des « substances apparentées », constituées par les précurseurs de synthèse, les produits secondaires, les intermédiaires de synthèse ainsi que les produits de dégradation.
Il existe également une catégorie de molécules qui, selon les cas, peut être considérée soit comme faisant partie du produit de synthèse, soit comme une impureté : les isomères.

- ✓ **Substances apparentées**

L'essai des « substances apparentées » est réalisé dans nombre de monographies afin de rechercher des éventuelles molécules organiques dérivées du produit synthétisé, ou potentiellement dangereuses. Il peut aussi bien s'agir de précurseurs de synthèse, que d'éléments intermédiaires, ou de produits de dégradation. L'essai des substances apparentées a donc pour objectif de contrôler la présence d'impuretés indésirables toxiques ou non. Ainsi, pour exemple, le paracétamol peut se dégrader facilement en 4-aminophénol. Hors, selon la fiche de données de sécurité de celui-ci, disponible auprès des fournisseurs de matière première **[44]**, le 4-aminophénol peut être très dangereux en cas de contact avec la peau, d'ingestion ou d'inhalation. Même si aucune précision sur les risques d'effets carcinogènes, tératogènes ou mutagènes n'est apportée par la fiche de sécurité, il est impératif de vérifier le non dégradation du paracétamol. D'autant plus que le 4-aminophénol possède également des propriétés néphrotoxiques **[45].**

En revanche, la monographie du benzoate de métronidazole prescrit un essai de substances apparentées permettant de détecter le métronidazole considéré ici comme impureté. En effet, dans le cadre de cette substance active, le métronidazole pur correspond à un « produit de dégradation » de la substance considérée, et ne doit donc pas être présent dans le produit « benzoate de métronidazole ». Par contre, l'acide benzoïque, autre produit de dégradation du benzoate de métronidazole, peut présenter des risques toxiques. Selon sa fiche de sécurité **[46]**, il présente une toxicité ciblée sur les poumons, le système nerveux et les membranes muqueuses. Il est donc préférable de vérifier qu'il soit ingéré dans les plus faibles quantités possibles. Il faut tout de même nuancer cette toxicité, car l'acide benzoïque est souvent utilisé dans le domaine pharmaceutique sans danger significatif pour les manipulateurs si les règles en vigueur dans les laboratoires sont respectées. Ce n'est donc pas non plus une substance d'une toxicité extrême. Mais il reste toujours préférable, ne serait-ce que par précaution, de limiter le plus possible les expositions inutiles à ce produit.

- ✓ ***Isomères***

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 **[47]**. Ceci peut entrainer aussi bien des propriétés thérapeutiques différentes, que des toxicités différentes. Dans certains cas, ces isomères peuvent cependant être utilisés en mélange racémique. C'est souvent le cas lorsque les propriétés sont extrêmement

proches, ou lorsqu'aucun des isomères ne montre de toxicité excessive. Le coût de la séparation serait donc superflu. Cependant, pour certains isomères, l'un peut avoir un effet thérapeutique, tandis que l'autre est toxique. La levodopa est un précurseur de la dopamine, utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson. Il possède un centre de chiralité qui permet la formation de 2 énantiomères. Seul l'énantiomère lévogyre (S)-(-) est conservé dans ce médicament. L'autre énantiomère, dextrogyre (R)-(+), est quant à lui toxique, et entraine 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.

La bupivacaïne, largement utilisée en tant qu'anesthésiant, présente un risque de toxicité cardiaque et de toxicité du SNC sous sa forme de mélange racémique, à cause de l'énantiomère (R)-(+). L'isomère lévogyre (S)-(-) a donc finalement été commercialisé afin de réduire ces risques, sous la forme de la lévobupivacaïne. Il en va de même pour la ropivacaïne, dont seul l'énantiomère (S)-(-) est retenu du fait d'un risque d'action arythmogène de l'autre isomère. Celui-ci possède en outre une action thérapeutique beaucoup plus faible et de plus courte durée que son antipode lévogyre. Pour le propoxyphène, molécule possédant deux centres de chiralité, les isomères ont des activités différentes. En effet, l'isomère (2S,3S)-(+), appelé dextropropoxyphène, possède des propriétés analgésiques puissantes, alors que son isomère (2S,3R)-(-), le lévopropoxyphène, possède des propriétés antitussives. Il devient donc évident que chaque diastéréo-isomère constitue une impureté en regard du médicament constitué par l'autre isomère.

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.

B. Impuretés inorganiques

Les impuretés inorganiques font référence aux éléments tels que les catalyseurs chimiques de réaction, source fréquente de métaux lourds, chlorures, sulfates, etc…

La présence potentielle de ces éléments est presque systématiquement vérifiés car ils sont très couramment utilisés au cours des synthèses et représentent un danger pour la santé publique.

Les métaux lourds représentent une catégorie d'impuretés qu'il est absolument indispensable de rechercher afin de vérifier la conformité de la substance contrôlée. L'essai des métaux lourds permet de rechercher les éléments suivants :

Plomb	Mercure	Ruthénium	Palladium	Antimoine
Cuivre	Cadmium	Or	Vanadium	Etain
Argent	Bismuth	Platine	Arsenic	Molybdène

Parmi ceux-ci, le plomb, élément le plus fréquemment rencontré, est utilisé comme mode d'expression des résultats de l'essai : « ppm de plomb ». Par exemple **[48-49]**, l'intoxication au plomb peut être extrêmement dangereuse que ce soit chez l'adulte ou chez la femme enceinte, ou allaitant son bébé. En effet, le plomb franchit sans difficulté la barrière placentaire et passe également dans le lait maternel. Chez l'enfant, ces effets peuvent être potentialisés car leurs organes sont en plein développement, et leur absorption intestinale est approximativement trois fois plus importante que chez l'adulte. L'intoxication infantile au plomb s'appelle le saturnisme **[50].** C'est une maladie extrêmement grave, qui peut laisser des séquelles très handicapantes.

C. Solvants résiduels

En cas d'utilisation de solvants de classe 1 ou 2 durant la dernière phase de synthèse d'un médicament, un essai de solvants résiduels doit être obligatoirement mis en place. C'est également le cas si un solvant est utilisé avant la dernière phase de synthèse, mais que son utilisation n'est pas suivie par une procédure validée d'élimination de ce solvant. Dans ces conditions, des traces de ces solvants peuvent subsister. L'essai « solvants résiduels » permet de vérifier les taux auxquels ces solvants sont présents. Les solvants organiques, très lipophiles, présentent tous des affinités pour les organes riches en lipides. Les principales cibles de ces solvants organiques sont donc la peau, le système nerveux, le foie et les reins.

En tant que première barrière de défense, la peau peut être fréquemment exposée à ces solvants, surtout pour les techniciens et autres manipulateurs présents dans la chaine de production pharmaceutique.

« Les solvants c'est pas fait pour se laver les mains » **[51]**. Ils ont une action plus ou moins agressive sur la peau et les muqueuses, et peuvent entrainer des dermatoses

parfois importantes. De plus, les solvants passent facilement la barrière cutanée du fait de leur lipophilie, ce qui peut entrainer de graves troubles toxiques.

Cette toxicité s'exprime également sur le système nerveux central, et peut se manifester aussi bien par de légers états d'ébriété, que par

- des troubles du sommeil
- des difficultés de concentration
- des pertes de la mémoire
- des troubles de l'humeur, irritabilité
- des tendances dépressives
- une altération des fonctions cognitives
- une diminution de la dextérité manuelle

Dans les cas extrêmes, une exposition plus importante peut aboutir au coma profond, voire au décès.

Dans des cas de toxicité à long terme, le système nerveux périphérique peut également être atteint. Par exemple, le méthanol possède une toxicité ciblée sur le nerf optique, pouvant aller jusqu'à la cécité.

Les solvants sont également très toxiques pour le foie et le rein, ces deux organes étant chargés de l'élimination de toutes les substances néfastes pour l'organisme. Les solvants halogénés sont particulièrement actifs sur ces organes.

Ils entrainent fréquemment des insuffisances rénales pouvant même aller jusqu'à des nécroses rénales et hépatiques en cas d'exposition importante.

Une composante anémiante est également souvent retrouvée dans les solvants organiques. Les solvants les plus toxiques, tels que le benzène ou le tétrachlorure de carbone, peuvent avoir des effets mutagènes, carcinogènes et toxiques pour la reproduction.

Du fait de la capacité des solvants organiques à traverser toutes les membranes lipidiques, dont la barrière placentaire, les femmes enceintes doivent être particulièrement protégées afin que le développement foetal ne soit pas perturbé par ces solvants. En plus des causes de toxicité immédiate, il peut être important de vérifier les taux de solvants résiduels à d'autres fins **[52].**

D'une part, ces solvants résiduels peuvent influer sur l'interaction contenant-contenu. En effet, s'il reste trop de solvants dans le produit synthétisé, il se peut qu'ils aient une action sur le contenant dans lequel est stockée la substance. Ceci pourrait engendrer une augmentation des quantités d'impuretés présentes dans la substance, et donc le risque encouru par les futurs utilisateurs de ce produit. D'autre part, une forte quantité de solvants résiduels peut éventuellement engendrer des modifications sur les propriétés physico-chimiques du principe actif ou des excipients. Cela peut par exemple modifier la mouillabilité ou la solubilité des cristaux constituant la substance active, ce qui peut présenter d'importants problèmes dans la fabrication ultérieure. Enfin, si une certaine quantité de solvants résiduels est encore présente dans la formulation finale, on risque de constater une inappétence du patient pour le médicament, en raison de l'odeur ou du goût désagréable ainsi provoqué.

C. Cas des fraudes

Il existe des impuretés extrêmement difficiles à détecter car elles sont issues de « l'innovation » des contre-façonniers **[53]**. Certains fournisseurs peuvent avoir recours à des subterfuges afin d'obtenir un produit moins coûteux à la production, ou pour palier une pénurie d'un des constituants du produit.

Un produit contenant une telle « impureté » ne peut être déclaré conforme. Cependant, ces fraudes sont difficilement détectables. Ces substituts, d'origine souvent inconnue, peuvent entrainer des conséquences néfastes pour la santé publique. Un exemple de fraude dont les répercussions sur la santé publique se sont révélées désastreuses est le cas de l'héparine frauduleuse survenu entre novembre 2007 et août 2008. Cette affaire est à l'origine de la mort de 130 personnes environ (dont plus de 80 aux Etats-Unis).

En effet, pour faire face à la demande croissante d'héparine, certains sites chinois avaient utilisé de la chondroïtine persulfatée dans leurs héparines sodiques. Cette substance contaminant est retrouvée sur des produits fabriqués à partir de sources chinoises sur une partie de l'année 2007 (10 lots de produits finis et 2 lots de matières premières). Des impuretés naturelles ont également été mises en évidence, dont l'une est le dermatan sulfate, présent dans 35 lots de produits finis et dans 21 lots de matières premières, tous correspondant à une production d'origine chinoise.

A la suite de ces accidents, l'Afssaps a intégré de nouveaux essais à effectuer sur les héparines sodiques dans sa note du 25 Avril 2008 : « Exigences de l'Afssaps pour les héparines du marché national » :

- Contaminant per-sulfaté indétectable : inférieur au seuil de détection de 1% en RMN proton
- Taux de dermatan sulfate inférieur ou égal à 5% en RMN proton
- Absence d'impureté non identifiée.

Les héparines de bas poids moléculaire étant fabriquées à partir des héparines sodiques, un essai de contaminant persulfaté a également été ajouté à leurs monographies.
Une recherche de protéines animales autres que porcines a également été intégrée afin que les abus de production de chondroïtine à partir de matière première autre que porcine soient détectés.
Afin d'avoir un impact le plus faible possible sur la santé publique, toutes ces impuretés et ces produits plus ou moins dangereux doivent donc être maintenus aux taux les plus faibles possibles.

Chapitre 4 :

PARTIE EXPERIMENTALE

4.1 Introduction :

Ce présent travail expérimental a été réalisé au niveau de l'entreprise ANTIBIOTICAL-Saidal en collaboration avec le laboratoire d'analyse de la faculté des Sciences

L'objectif de ce travail est l'étude des conditions de dégradation d'une substance pharmaceutique (la vancomycine).cette dernier va exposée a des milieux agressives : milieu chaud, basique et acide puis analysé après un temps prédéterminer pour évaluer l'influences de ces milieu sur la substance étudiée.

L'analyse a été effectuée par des méthodes physicochimiques telles que l'utilisation de HPLC et UV.

Donc, dans cette partie, nous présenterons les différents protocoles de préparation des échantillons et leurs analyses. Par la suite on va interpréter chaque résultat et donner une conclusion globale sur la dégradation de la vancomycine.

4.2 Matériels et produits

4.2.1 Produit chimique utilises

Les produit chimique utilises durant cette étude sont de qualité analytique. Ils ont été manipules sans purification préalable.

Les principaux produits utilisés pour la réalisation de nos expériences sont classés dans le tableau suivant :

Tableau 4. 1 récapitulatifs des produits utilisé

Produit	Caractéristique
HCl	• L'acide chlorhydrique • La masse molaire 36,461 ± 0,002 g/mol H 2,76 %, Cl 97,23 %
NaOH	• L'hydroxyde de sodium • La masse molaire 39,9971 ± 0,0004 g/mol H 2,52 %, Na 57,48 %, O 40 %,
NaCl	• La solution de chlorure de sodium stérile à 0.9 %,

4.2.2 Appareils d'analyse :

Le tableau résume l'ensemble des équipements utilisés dans ce travail.

Tableau 4. 2 liste des matériels utilise

Matériel	Modèle
Balance électrique	**Marque :** SARTORIUS **Modèle :** BL 60S
Agitateur magnétique	Micro V (0-1100 rpm, modele 4805-00)
Etuve	Memmert
Des fioles Des pipettes	verre traité
Des flacons ombres	verre traité

4.3 Les outilles analytiques

Une techniques d'analyse ont été appliques pour contrôler la dégradation de notre substance pharmaceutique

4.3.1 Spectrophotométrie UV-visible

La spectroscopie UV-Visible permet d'accéder qualitativement à des renseignements quant à la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon mais également de déterminer quantitativement la concentration d'espèces absorbant dans ce domaine spectral. Non destructive et rapide, cette spectroscopie est largement répandue en travaux pratiques de chimie ainsi qu'en analyse chimique ou biochimique. Le Spectrophotomètre-visible utilise de marque Perkin Elmer de modèle Lamba 25 il est commande par un ordinateur DELL et une imprimant CANON et les cuvettes de quartz avec une longueur de 1.0 cm.

4.5 Préparation des solutions

4.5.1 Mode opératoire :

Préparation de la solution vancomycine 0.08mg/ml

- Avec la balance électrique peser 0.04mg de la vancomycine poudre
- Mettre dans une fiole ombre de 50ml compléter avec le NaCl 0.9% jusqu'à le très de jauge
- Laisser la fiole sous l'agitation magnétique quelque minute pour assurer que la vancomycine est bien dissous.
- Verser le contenu de la fiole dons un flacon ombré pour éviter l'influence de la lumière sur notre solution
- fermer le flacon et laisser au repos jusqu'à utilisation

4.6 Dégradation de la vancomycine par des milieux agressifs

Cette étape consiste à exposer la vancomycine à des milieux agressifs acide et basique le (HCl) et le (NaOH) avec des différant concentrations.

4.6.1 Essai de dégradation de la vancomycine sous condition de milieux acide le HCl 0.1N

Les concentrations de HCl utilisé sont 0.1N et 0.5N

A. Mode opératoire

- Préparer une solution de vancomycine de 0.08 (mg/ml) dans le NaCl 0.9%
  Dans une fiole de 10 ml Introduit :
- 4 ml de HCl 0.1N
- 2ml de la solution de vancomycine préparé

Laisser le mélange pendant 1h puis faire neutraliser le HCl avec l'ajout de NaOH 0.1 N

b. Objectif de neutralisation

Les acides et les bases sont des substances antagonistes qui réagissent en solution, formant de l'eau et un sel au cours d'un phénomène appelé **neutralisation**.

Exemple : $HCl + NaOH \longrightarrow H_2O + NaCl$

Soit en détail : $HCl + H_2O \longrightarrow H_3O^+ + Cl^-$ et $NaOH \longrightarrow Na^+ + OH^-$

$Na^+ + OH^- + H_3O^+ + Cl^- \longrightarrow 2\ H_2O + Na^+ + Cl^-$

La neutralisation n'est donc rien d'autre que la réaction entre les ions $\mathbf{H_3O^+}$ et $\mathbf{OH^-}$ avec formation d'eau.

L'objectif de la neutralisation dans notre essais et d'avoir un milieu qui contient que la solution de vancomycine dans le NaCl donc éliminer l'existence de HCl

4.6.2 Essaie de dégradation de la vancomycine sous condition de milieux acide le HCl 0.5N

A Mode opératoire

- Préparer une solution de vancomycine de 0.08 (mg/ml) dans le NaCl 0.9%
  Dans une fiole de 10 ml Introduit :
- 4 ml de HCl 0.5N
- 2ml de la solution de vancomycine préparé

Laisser le mélange pendant 1h puit faire neutraliser le HCl avec l'ajout de NaOH 0.5 N

4.6.3 Essai de dégradation de la vancomycine sous condition de milieux basique le NaOH 0.1N

Dans une fiole de 10ml introduit :

- 4 ml de NaOH 0.1N
- 2 ml de la solution de vancomycine 0.08 (mg/ml) préparé dans le NaCl

Laisser le mélange pendant 1h puit faire neutraliser le NaOH avec l'ajout de HCl 0.1 N

4.6.4 Essai de dégradation de la vancomycine sous condition de milieux basique le NaOH 0.5N

Dans une fiole de 10ml introduit :

- 4 ml de NaOH 0.5 N
- 2 ml de la solution de vancomycine 0.08 (mg/ml) préparé

Laisser le mélange pendant 1h puis faire neutraliser le NaOH avec l'ajout de HCl 0.5 N

L'analyse par L'UV-visible à donner

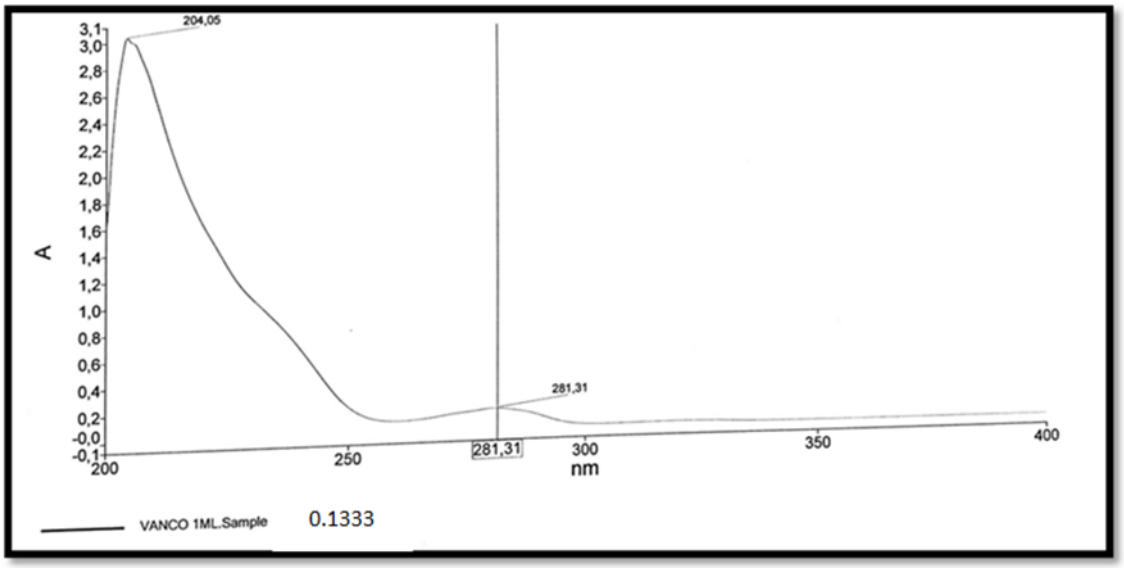


Figure 4.1 spectre uv de la vancomycine standard

La figure montre que la vancomycine 0.08 mg/ml absorbe a la logeur d'onde 281.31 cm^{-1} avec une absorbance de 0.1333 A

Tableau 4.3 résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons par UV

Milieux	HCl 0.1 N	HCl 0.5 N	NaOH 0.1N	NaOH 0.5 N
A	0.1007	0.0167	0.1111	0.0523

Le résultat du tableau 4.3. Montrent des valeurs de densité optiques inferieurs qu celles de l'échantillon témoin, ce qui explique la de gradation de la vancomycine tel que

- Pour les milieux acides

HCl 0.1 N une dégradation de 40% VOIR figure 4.1.

HCl 0.5 N une dégradation de 90%

- Pour les milieux basiques

NaOH 0.1N une dégradation de 33.75% VOIR figure 4.1.

NaOH 0.5N une dégradation de 68.75% VOIR figure 4.1.

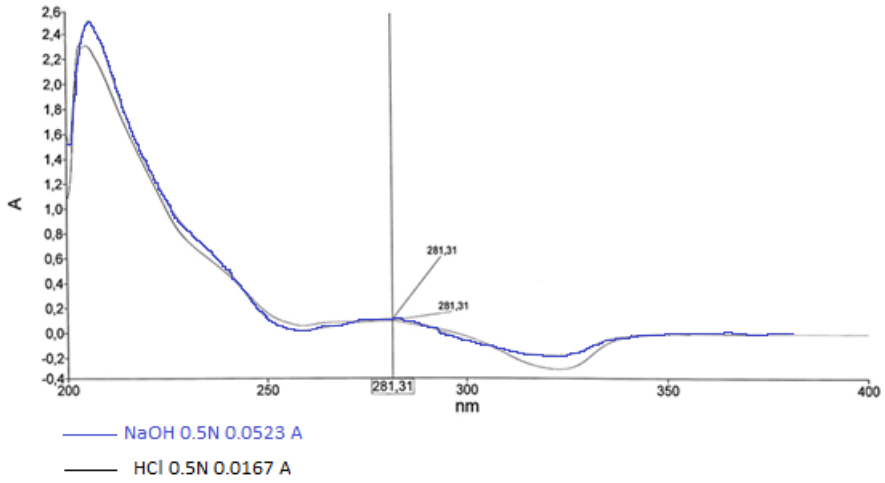


Figure 4.2 spectre uv de la vancomycine ou milieux acide HCl 0.5 N et basique NaOH 0.5N

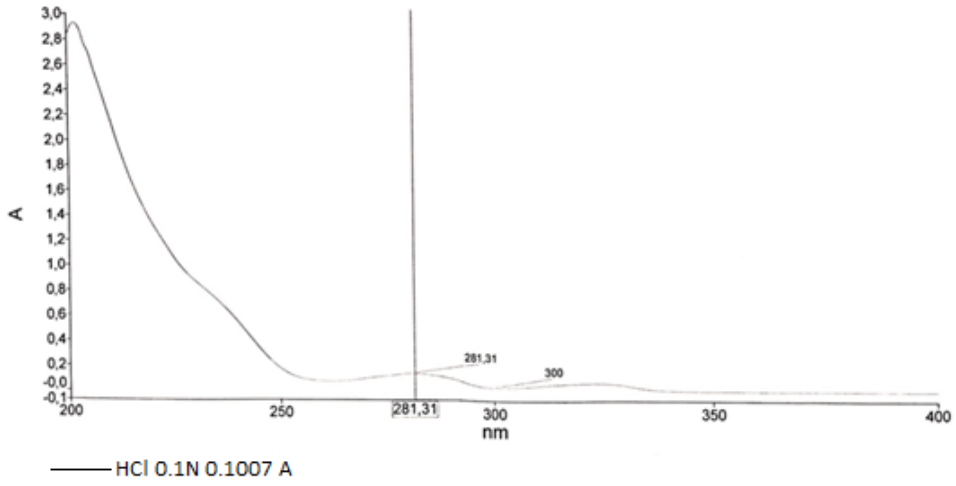
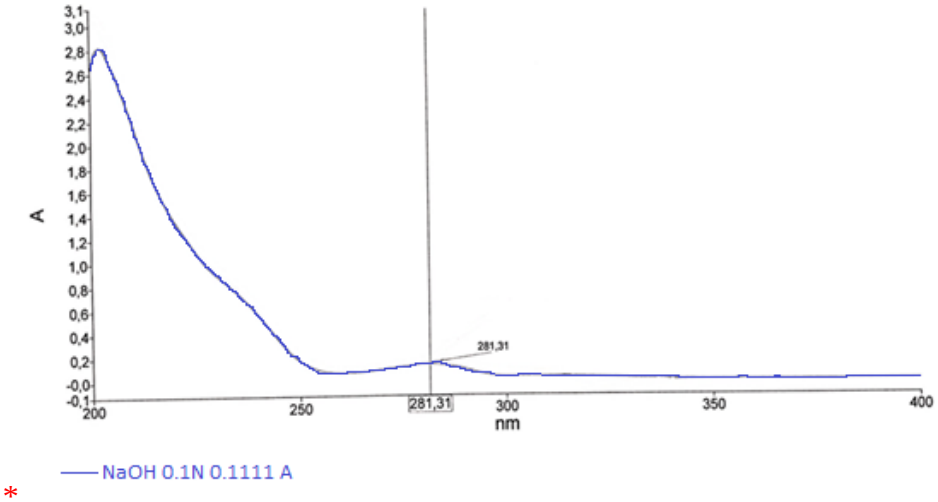


Figure 4.3 spectre uv de la vancomycine ou milieux acide HCl 0.1N



*

Figure 4.4 spectre uv de la vancomycine ou milieux basique NaOH 0.1N

4.7. Etude de dégradations de la vancomycine à des différentes températures

Cette étude consiste à exposer la vancomycine à des différant températures avec une analyse successive de l'échantillon chaque une heure.

4.7.1 Préparation des échantillons

La solution de vancomycine et prépare à base NaCl 0.9% comme solvant et de vancomycine comme soluté avec une concentration de 0.08N.

A. Mode opératoire :

A.1 Préparation de solution témoin

Dans une fiole de 50 ml on introduit :

- 40 mg de vancomycine
- Compléter le volume jusqu'à trait jauger par NaCl 0.9%
- Laisser la fiole sous agitation magnétique jusqu'à la dissolution total de vancomycine

A.2 Préparation de l'échantillon :

Dans une fiole de 50 ml on introduit :

- 40 mg de vancomycine
- Compléter le volume jusqu'à trait jauger par NaCl 0.9%

- Laisser la fiole sous agitation magnétique jusqu'à la dissolution total de vancomycine
- Placer la fiole dans l'étuve régler à 80° pendant 5 h

Faire analyser la solution témoin pour déterminer la longueur d'onde dans laquelle la vancomycine absorbe

B. Analyse d'échantillon

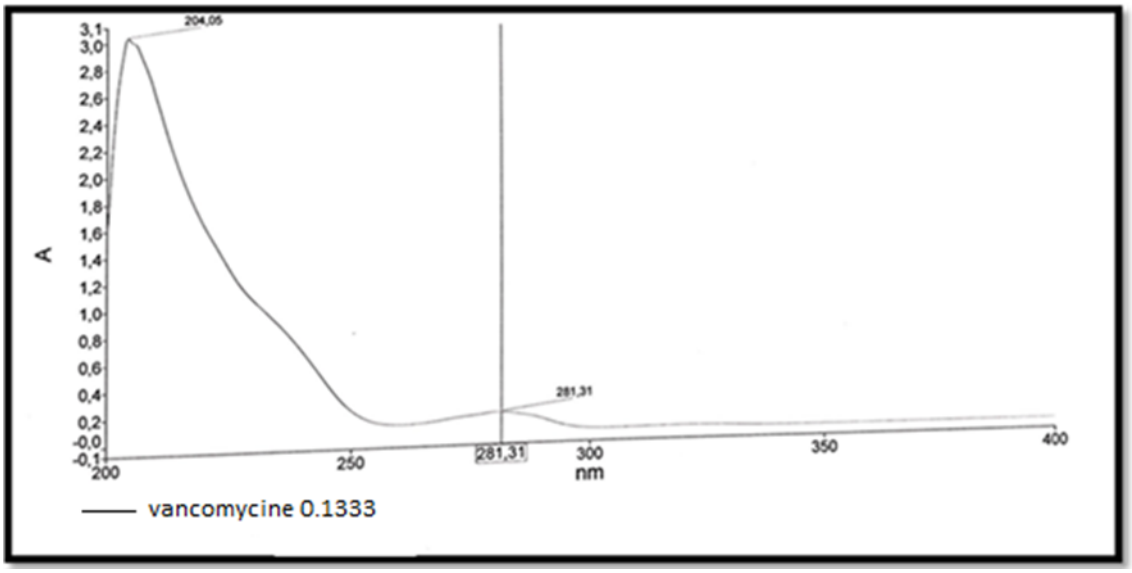


Figure 4.5 spectre uv de la vancomycine standard

Chaque heure prendre des prélèvements à partir de la solution échantillon mis précédemment dans l'étuve réglé à T=80°c

Tableau4.4 mesure de l'absorbance de vancomycine exposé à la chaleur T=80°c

Temps	1h	2h	3h	4h	5h
L'absorbance	0.1259	0.1310	0.1286	0.1255	0.1265
Concentration Mg/ml	0.0606	0.0631	0.0619	0.0604	0.0609

4.8. Résultat et discussions

Le tableau4.4 représente les valeurs de l'absorbance de la vancomycine mesure après l'exposition de ce dernier a une température de 80°c, ou les valeurs sont proche de 0.1333A ce qui montre la non dégradation de notre substance pharmaceutique

Les résultats obtenus montrent que la vancomycine ne dégrade pas à 80°c

4.9. Etude de dégradation à T=120°C

Même protocole qu'on à utiliser avec la température présidant

L'analyse par UV à donner

Tableau 4.5 mesure de l'absorbance de vancomycine exposé à la chaleur T=120°C

Temps	1h	2h	3h	4h	**5h**
l'absorbance	0.1333	0.1292	0.1309	0.1271	**0.0165**
Concentration ml/mg	0.0642	0.0622	0.0630	0.0612	**0.0079**

4.9.1 Résultats et discussion

Le tableau 4.5 représente les valeurs de l'absorbance de la vancomycine mesure après l'exposition de ce dernier a une température de 120°C, ou les valeurs sont inferieur a 0.1333A ce qui montre la dégradation presque complète de notre substance pharmaceutique aux Cinquièmes heurs

4.3 La courbe d'étalonnage :

Préparer plusieurs échantillon a différentes concentrations (E_1=0.056N/ E_2=0.064N/ E_3=0.072N/ E_4=0.08N/ E_5=0.096N) et faire les analyses par l'UV-visible

Tableau 4.6 l'absorbance de défibrant concentration de la vancomycine

C	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5
A	0.21	0.24	0.2721	0.3071	0.3699

L'équation de BEER LOMBERT dit A=C.Ɛ.l

La loi de Beer-Lambert établit une proportionnalité entre la concentration d'une entité chimique et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu considéré. Le coefficient de proportionnalité est l'absorbance ou le coefficient d'absorption de celle-ci.

Avec :

l = longueur de la cuve (1 cm en général, avec une précision de 1 %)

C= concentration de la solution

ε = absorbance linéique décimale ou coefficient d'extinction spécifique qui dépend de la longueur d'onde. ε varie également en fonction des forces intermoléculaires et donc du Solvant utilisé.

- L'équation de la courbe d'étalonnage Do=2.0748*C

Donc par analogie on obtient Ɛ.L=2.0748 avec l= 1cm

Ɛ De la vancomycine = 2.0748

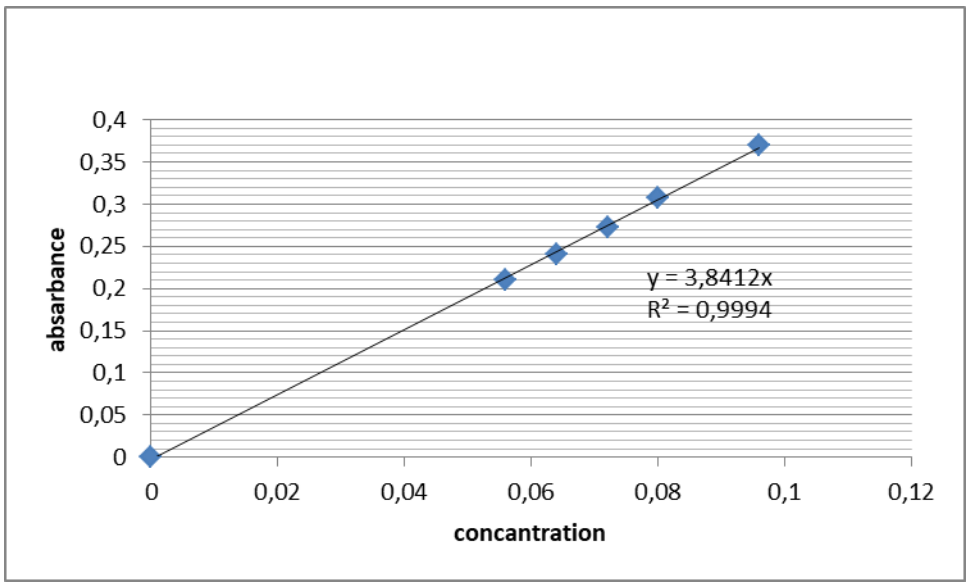


Figure 4.6La courbe détalonnage

4.10. Conclusion

Lors de cette presente étude, l'analyse d'ientification de la vancomycine a montré une conformité des tests physico-chimiques de ce principes actifs utilisés.

Une étude de dégradation de la vancomycine par des milieux agressive tel que les milieux acide, les milieux basique et par la température a permis de prendre des informations importantes sur les conditions de dégradation de cette substance.

Dans ce sens, les études montrent que la vancomycine est dégradé dans le milieu HCL de 0.1 N avec 40% et 90 % de dégradation pour la HCL 0.5 N.

Et pour les milieux basiques, la vancomycine est dégradé dans le milieu NaOH de 0.1N avec 33.57%, et 68.75 % de dégradation pour le NaOH de 0.5 N.

La dégradation de la vancomycine par la température montrent que cette dernière est non dégradable dans 80 C°, et l'exposition de ce PA à la température de 120 C° pendant 5h montre une dégradation de 87%.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

L'objectif de ce présent travail était l'étude de condition de dégradation d'une substance pharmaceutique « la vancomycine », la substance étudiée est un antibiotique de la famille des glycopeptides.

Dans un premier temps, les analyses d'identification et de caractérisation de ce principe actif à été effectuées selon les normes de la pharmacopée en vigueur. Des analyses physicochimiques ont révélés la conformité de la matière utilisée.

Une étude de degradation a permis de prendre des informations importantes , ou la vancomycine a montré une degradation importantes dans les milieux acides tels que le milieu HCL de 0.1 N et le milieu HCL de 0.5 N.

Les études montrent aussi une dégradation dans les milieux basiques, dans le NaOH de 0.1N et de 0.5 N. Mais a moins proportions que les milieux acides.

L'antibiotique étudié apparait une résistance dans les températures inferieure à 80 C° , par contre l'exposition de ce dernier à la température de 120 C° pendant 5h peut le dégrade avec une proportion importante.

Ce travail doit être complété par une étude plus performantes pour identifier la nature des impuretés issue lors de la dégradation de cette substance

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

[1] Robert Service (2017), Superantibiotic is 25,000 times more potent than its predecessor [archive], 30 mai 2017

[2] Boutten A. Créatinine. EMC (Elsevier Masson SAS Paris), Biologie clinique, 90-10- 0345.2010

[3] Mahri S, Nebbali N. (Février 2012). IMMUNOANALYSE ET TOXICOLOGIE Dosage de la Vancomycine Immunoturbidimétrie et HPLC-DAD. Mémoire de fin d'études non publié. Université D'ALGER.

[4] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (2004). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3rd. s. l.: Pharmaceutical Press. 2004.

[5] Meley R .Vancomycine. Cahier de formation biologie médicale, Dosage des médicaments tome II, BIOFARMA, N°18. 2000.

[6] Henard S, Rabaud C. Glycopeptides. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Traité de Médecine Akos, 5-0060,2012
http://microcsb.net/IMG/pdf/generalite-4.pdf
http://www.chu-nantes.fr/medias/fichier/particularites-de-l-adm-med-chez-enfants-et pa_1413387203533-pdf.

[7] Tazi A, Bricaire F. Choix d'un antibiotique. EMC (Elsevier Masson SAS Paris). Traité de Médecine Akos ,4-0840, 2007

[8] (Taketomo CK et al, 2011). Taketomo CK, Hodding JH, Kraus DM. Pediatric and neonatal dosage handbook. 18th ed. 2011-2012 Lexicomp. Neonatal formulary.

[9] Glatard Anaïs. (2013). Comparaison de différentes formules d'estimation de la fonction rénale pour la prédiction des concentrations de vancomycine en gériatrie par une approche de population. Thèse de doctorat non publiée. Université CLAUDE BERNARD – LYON 1.

[10] (Sakoulas G et al, 2003) Sakoulas G et al. J Infect Dis. 2003;187(6):929–938.

[11] (Tsuji BT et al, 2007) Tsuji BT et al. Agents Chemother. 2007;51(3):1089–91.

[12] Jehl F, Koebel C. Antibiotiques – bactéries : une relation (pharmaco) dynamique. Actualités en infectiologie. (EMC Elsevier Masson SAS Paris) revue francophone des laboratoires Juillet- Août 2011 - n°434.

[13] Dictionnaire Larousse®. Définition de la stabilité. Page consultée le 13 avril 2013. http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/stabilit%C3%A9/74408.

[14] Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée Isotechnie et Pharmacie Hospitalière - Application aux anticancéreux. Le référentiel du Gerpac. Coordination Gard C, Cazin JC, Arnaud P, Septembre 2006, 225p.

[15] Duriez A, Vigneron J, Zenier H, May I, Demoré B. Stability of Azacitidine Suspensions. Ann Pharmacotherapy. 2011; 45:546.

[16] Den Hartigh J, Brandenburg HCR, Vermeij P. Stability of azacitidine in lactated Ringer's injection frozen in polypropylene syringes. Am J Hosp Pharm 1989; 46: 2500-2505.

[17] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Stability testing of new drug Substances and products – ICH Q1A(R2) Step 4, February 2003.

[18] Bardin C, Astier A, Vulto A, Sewell G, Vigneron J, Trittler R, Daouphars M, Paul M, Trojniak M, Pinguet F. Guidelines for the pratical stability studies of Anticancer drugs: A European consensus conference. Ann Pharm Fr. 2011 ; 69 : 221-231.

[19] International Conference on Harmonisation of technical requirements for Registration of pharmaceuticals for human use. Specifications : Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products : Chemical substances –ICH Q6A, Step 4, October 1999.

[20] C.Ellie, V.Zanzi. Etudes de dégradation forcée au cours du développement pharmaceutique. STP pharma pratique 2007 ; 17(2) : p 89-99.

[21] Carstensen JT, Swarbrick J, Drug Stability Principles and Practices.1995, 2ème Edition: 127 – 156.

[22] Kennon L. Use of kinetic methods in storage stability studies on drugs and Pharmaceuticals. *Pharm sci* .1964; 53(7):815–818.

[23] Yang WH, Roy SB. Projection of tentative expiry date from one-point accelerated stability testing. Drug Dev Ind Pharm 1980; 6(6): 591–604.

[24] Witthaus G, Breimer DD, Speiser P. Accelerated Storage Tests: Predictive Value, Topics in Pharmaceutical Sciences. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1981: 275–290.

[25] Bakshi M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. Pharma Technol, 2000; 1–14

[26] Boccardi G, Deleuze C, Gachon M, Palmisano G, Vergnaud JP. Autoxidation Of drugs: prediction of degradation impurities from results of reaction with radical chain initiators. J Pharm Sci 1992; 81(2):183–185.

[27] Weiser WE. Developing analytical methods for stability testing. Pharma Technol 1998:20–29

[28] Singh S, Bakshi M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. Pharma Technol. 2000, 1–14.

[29] Alsante KM, Friedmann RC, Hatajik TD, Lohr LL, Sharp TR, Snyder KD,Szczesny EJ. Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. Academic Press, 2001: 85–172.

[30] Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajik TD, Motto MG. Available guidance and best practices for conducting forced degradation Studies. Pharma Technol. 2002; 26(2): 48–54

[31] Steven W. Baertschi. Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation. Taylor & Francis Group. 2005, 1-469

[32] http://fr.wikipedia.org/wiki/Loi_d'Arrhenius

[33] Waterman KC, Adami RC, Antipas AS, Arenson DR, Carrier R, Hong J,Landis MS, Lombardo F, Shah JC, Shalaev E, Smith SW, Wang H. Hydrolysis in pharmaceutical formulations. Pharm Dev Tech 2002; 7(2): 113–146.

[34] Alsante KM, Martin L, Baertschi SW. A stress testing benchmarking study. Pharm Technol ; 2003; 27(2):60–72.

[35] Espinosa S, Bosch E, Roses M. Retention of ionizable compounds in highperformance liquid chromatography. IX. Modeling retention in reversedphase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with acetonitrile- water mobile phases. J Chromatogr A 2002; 947(1):47–58

[36] Hart/ Conia. Introduction à la chimie organique, 1993, 177-190

[37] Turner JO. The acid-catalyzed decomposition of aliphatic hydroperoxides: Reactions in the presence of alcohols. *Tetrahedron Lett*. 1971 ; 14:887–890

[38] ICH Topic Q1B . Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products 1998 CPMP/ICH/279/95.

[39] Pharmacopée européenne EDQM 8ème édition (8.2), (2014)

[40] Pharmacopée américaine USP 37, NF 32, (2014)

[41] International Conference on Harmonisation, Impurities in New Drug Substances, Draft, Q3A(R), February, (2002)

[42] International Conference on Harmonisation, Impurities in New Drug Products, Draft, Q3B(R), October, (1999).

[43] ICH Q1A: International Conference on Harmonisation, Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A(R2), February, (2003)

[44] Science Lab. Material Safety Data Sheet para-aminophenol. Janvier 2010. 1 p. [En ligne]. Disponible sur www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9922896.

[45] HARMON R.C., KININGHAM K.K., VALENTOVIC M.A. Pyruvate reduces 4- aminophénol in vitro toxicity. [En ligne]. Disponible sur www.sciencedirect.com.

[46] Science Lab. Material Safety Data Sheet benzoic acid. Janvier 2010. 1 p. [Enligne]. Disponible sur http://www.sciencelab.com/xMSDS-Benzoic_acid-9927096

[47] KIRKACHARIAN S. Chiralité et médicaments. 16 p. [En ligne]. Disponible sur http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/qualite-etsecurite-au-laboratoire-ti620/chiralite-et-medicaments-p3340/

[48] MIQUEL G. Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques. Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. [En ligne]. Disponible sur http://www.senat.fr/rap/l00-261/l00-2611. pdf

[49] PICOT A. Congrès ADNO (29 Novembre 2003, Paris). Intoxication de l'organisme par les métaux lourds et autres toxiques : le mercure, le plomb et le cadmium, trois métaux traces toxiques. 14 p. [En ligne]. Disponible sur http://www.amiesfrance.info/docs/donnees_scientifiques/Intox_organism_metaux_lourds. pdf.

[50] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Saturnisme : Quelles stratégies de dépistage chez l'enfant. [En ligne]. Disponible sur http://www.inserm.fr/thematiques/sante-publique/expertises-collectives.

[51] Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents Du travail et des maladies professionnelles. Dossier web : Les solvants. (Mise à jour le 21/10/2010). [En ligne]. Disponible sur http://www.inrs.fr.

[52] BAUER M. Analyse des solvants résiduels dans les produits pharmaceutiques. 20 p. [En ligne]. Disponible sur http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesuresanalyses-th1/qualite-et-securite-au-laboratoire-ti620/analyse-des-solvants-residuels-dans-lesproduits-pharmaceutiques-p3260/.

[53] PENNAFORTE S. La contrefaçon des médicaments. [En ligne]. Thèse d'état de docteur en pharmacie. Paris : Université de Paris V, 1999. 127 p. Disponibles sur http://www.chmp.org/pennaforte1.pdf.