

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE

-----  
UNIVERSITÉ DE BAMAKO

-----  
FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE  
ET D'ODONTO – STOMATOLOGIE  
BAMAKO

REPUBLIQUE DU MALI  
Un Peuple – Un But – Une Foi

**ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2004 – 2005**



**MISE AU POINT DE METHODES  
D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE DES  
MEDICAMENTS ANTIRETROVIRAUX  
UTILISES AU MALI**

**THÈSE**

**DE PHARMACIE, DIPLÔME D'ÉTAT  
PESENTÉE ET SOUTENUE PAR  
Monsieur TRAORE Abdoulaye Sayon**

**MEMBRES DU JURY**

<b>Président :</b>	<b>Professeur Boubacar Sidiki CISSE</b>
<b>Membres :</b>	<b>Professeur Moussa HARAMA</b>
	<b>Docteur Mamadou Seydou KONE</b>
<b>Directeur de Thèse :</b>	<b>Professeur Gaoussou KANOUTE</b>

## **REMERCIEMENTS**

A Dieu le tout puissant

En toi, je remets toute mon existence, tu étais là au début de ce travail, tu as guidé mes pas selon ta volonté. Tu es là à la fin de ce travail. Tu resteras toujours avec moi et avec les autres qui te louent.

Rien ne me manque, et je ne crains rien. Accepte, mon Dieu cet humble et modeste fruit de la franche bonté et de ton immense amour.

Je profite de cette occasion solennelle, pour adresser mes vifs et sincères remerciements.

**A la famille TRAORE à Kati, Dialaya**

**A la famille SANGARE à Kati coura**

**A la famille SAMAKE à Bamako Lafiabougou**

**A la famille KOUYATE à Bamako Oulofobougou Bolibana, Karan**

Pour vos concours, vos conseils et bénédictions. Trouvez – ici l'expression de mes sentiments de reconnaissance de ma profonde gratitude.

A ma Tante Mme Kouyaté Mah Kandia Keita

Vous avez consenti de lourds sacrifice pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Que ce travail soit un témoignage d'affection et de gratitude pour votre soutien. Ce jour est aussi le votre

A mes tantes Aissata Sangaré, Fatou Sangaré, Ata Traoré, Yasso Sangaré, Ramata Sangaré

Vous qui avez toujours soutenu dans les entreprises de la vie, tout mon attachement et toute ma disponibilité.

A mon oncle Diakardia Sangaré

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

Votre soutien ne m'a à aucun moment fait défaut. Accordez-moi l'occasion d'exprimer ma reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A mes cousins et cousines.

Je me garde de citer de noms de crainte d'en omettre. Ce travail est aussi le vôtre. A vous tous ma grande tendresse et mon estime.

A tous les amis

Vous avez fait tous ce qu'on peu attendre d'un ami.

Je garderai les meilleurs souvenirs de votre franche amitié

Aux docteurs Mahamadou Seydou KONE, Sindy BERTHE, Amara Cherif TRAORE, Djibril T. KONATE.

Vos soutiens, conseils, encouragements et votre contribution de qualité incessante m'ont aidé à surmonter les obstacles rencontrés dans l'élaboration de ce travail qui est le votre.

Que Dieu me donne la force de vous servir un jour.

A tout le personnel de LNS

La réalisation de ce travail est le fruit de votre accueil chaleureux, votre soutien constant, votre sympathie et votre franche collaboration. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

### **Aux Membres de jury**

De bon cœur, vous avez accepté de siéger dans ce jury pour juger ce travail. Vos critiques, remarques et suggestions seront les bien venues et contribueront à enrichir cette oeuvre dans l'intérêt de la science.

Nous vous remercions infiniment.

#### **A Notre maître et président du jury**

Professeur Boubacar Sidiki CISSE

Professeur de toxicologie à la FMPOS ;

Premier recteur de l'université du Mali ;

Conseiller technique du Ministère de la Santé.

Votre abord facile, votre franc parler et votre grande expérience, la rigueur dans le travail, l'amour du travail bienfait, le souci constant et permanent de la formation, l'amitié profonde pour vos collaborateurs et vos élèves font de vous un homme très admirable et un très bon maître.

En acceptant de présider ce jury, vous nous faites un honneur auquel nous sommes très sensibles

#### **A Notre maître membre de jury**

Professeur Moussa HARAMA.

Chef de laboratoire de chimie à la faculté de Médecine de Pharmacie et

d'Odontostomatologie ; Professeur de chimie organique ;

Responsable des cours et TP de chimie organique, chimie analytique qualitative à la FMPOS. Nous avons suivi avec un intérêt tout particulier vos cours, nous apprécions à leurs justes valeurs l'état de votre savoir, votre dévouement à la formation des étudiants et l'éloquence de

Votre enseignement.

Aujourd'hui vous avez bien voulu accepter de juger ce travail.

Veuillez agréer l'expression de notre profonde reconnaissance.

Thèse Pharmacie/LNS

**A Notre maître membre de jury**

Docteur Mamadou Seydou KONE

Pharmacien au LNS ;

Chef d'unité physico-chimie du département contrôle de qualité des médicaments au LNS

Votre disponibilité, l'attention particulière que vous portez à l'encadrement des étudiants stagiaires dans votre service nous ont impressionnées.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Nous ne cesserons jamais de vous en remercier.

**A Notre maître et Directeur de thèse**

Professeur Gaoussou KANOUTE.

Pharmacien ;

Professeur de chimie analytique à la FMPOS ;

Ancien Directeur général de l'hôpital du point G ;

Ancien conseiller technique charge des reformes des hôpitaux au Ministère de la Santé, de la Solidarité et des personnes Agées ;

Directeur général du Laboratoire National de la Santé (LNS).

Votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre humanisme et votre modestie, forcent le respect et incitent à l'admiration.

Vous nous avez enseigné l'électro - chimie avec les qualités d'un grand maître, vous resterez un exemple pour nous.

Nous vous prions de trouver dans ce modeste ouvrage l'expression de notre profonde gratitude.

**Liste des abréviations, Sigles et Symboles**

A = Absorbance  
ADN = Acide désoxyribonucléique  
AMM = Autorisation de Mise sur le Marché  
ARN = Acide ribonucléique  
ARV = Antirétroviraux  
AZT = Zidovudine  
B = boîte  
CESAC = Centre d'Ecoute de Soins d'Animation et de Conseil  
CCM = Chromatographie sur Couche Mince  
Cp = comprimé  
CV = Coefficient de Variation  
D4T = Stavudine  
ddl = Didanosine  
DCI = Dénomination Commune Internationale  
ddc = Zalcitabine  
DPM = Direction de la Pharmacie et du Médicament  
DO = Densité optique  
EDSIII = Enquête Démographique de la Santé III  
EFV = Efavirenz  
J = jour.  
HGT = Hôpital Gabriel Touré  
H P G = Hôpital du Point G .  
HPLC = Chromatographie Liquide Haute Performance  
H = Heures  
INTR = Inhibiteurs Nucleosidiques de la Transcriptase Reverse  
INNTR = Inhibiteurs Non Nucleosidiques de la Transcriptase Reverse  
IP = Inhibiteurs de la Protéase  
IMAARV = Initiative Malienne d'Accès aux Antirétroviraux  
IdV = Indinavir  
Kg = Kilogramme  
Km<sup>2</sup> = Kilomètre carré  
LCR = Liquide Céphalorachidien  
LNS = Laboratoire National de la Santé

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'Identification des ARV**

MST/Sida = Maladies Sexuellement Transmissibles, Sida

NVP = Nevirapine

NFV = Nelfinavir

g = gramme

ng = nanogramme

mg = milligramme

nm = nanomètre

ml = millilitre

N = Normalité

ONG = Organisations non Gouvernementales

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

P.a = Principe actif

PE = prise d'essai

PPM = Pharmacie Populaire du Mali

PNLS = Programme National de Lutte contre le Sida

PVVIH/Sida = Personne vivant avec le VIH/Sida

TR = Transcriptase Reverse

TI = Transcriptase Inverse

3TC = Lamivudine

UV = Ultra - violet

VIH = Virus de l'Immunodéficience Humaine

% = pourcentage

Rf = Red Facteur

Tr = Temps de rétention

µg = micro gramme

µl = micro litre

V = volume

V M = Volume Moyen

## **Sommaire**

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>Aux Membres de jury .....</b>	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
1.1 Objectif général : .....	9
1.2 Objectifs spécifiques : .....	9
<b>II. GENERALITES .....</b>	<b>10</b>
2.1 Rappel sur le Syndrome d'Immuno Déficience Acquise (SIDA) .....	10
2.2 Situation Epidémiologique du VIH/Sida au Mali .....	11
2.3 Rappel sur les anti rétro viraux .....	12
2.4 Quelques définitions et notions préalables du médicament [21].....	16
2.5 Etude monographique des neuf médicaments a r v [5] .....	17
2.6 Notion d'assurance de la qualité .....	26
2.7 Notion de contrôle de qualité .....	26
2.8 Système OMS de certification.....	29
2.9 Normes de qualité.....	29
2.10 Notion générale sur le spectrophotomètre UV/Visible et la chromatographie sur couche mince (CCM). .....	30
2.10.1 Rappel théorique sur le spectrophotomètre UV/visible .....	30
2.10.2 Chromatographie sur couche mince (CCM) [17].....	33
2.11 Validation analytique [7].....	34
2.11.1 Les critères de la validation.....	34
<b>III. METHODOLOGIE GENERALE DE L 'ANALYSE .....</b>	<b>37</b>
3.1 Type et lieu d'étude.....	37
3.2 Échantillonnage .....	37
3.3 Critères d'inclusion : .....	37
3.4 Critères d'exclusion : .....	37
3.5 Traitement des données .....	37
3.6 Plan analytique .....	37
3.6.1 Méthodologie générale de la mise au point : .....	37
3.6.2 Méthodologie de l'expérimentation .....	42
<b>IV. APPLICATION – RESULTATS.....</b>	<b>44</b>
4.1 Validation du système .....	47
4.2 Spectres d'absorption dans l'UV des 8, molécules de l'étude .....	61
4.3 Méthodes d'identification des molécules ARV .....	71
4.4 Protocole d'analyse spectrophotométrique de huit molécules .....	73
4.5 Dosage et identification des principes actifs dans le produit fini : chromatographie liquide haute performance .....	83
4.5.1 Mise au point de la séparation : .....	83
4.5.2 Les chromatogrammes des références et celui de l'association .....	86
<b>V. COMMENTAIRE - DISCUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>VI. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>93</b>
<b>VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>94</b>

## **I. INTRODUCTION**

Il ne peut y avoir de soins sans médicaments, mais surtout il ne peut y avoir de soins de qualité sans médicaments de qualité.

La circulation de médicaments de mauvaise qualité, mal fabriqués ou contrefaits, représente une menace permanente pour la santé publique. Le trafic semble s'être aggravé au cours des dernières années et touche plus particulièrement les pays en développement [14].

Sur le marché pharmaceutique africain, les proportions de médicaments dangereux ou inefficaces seraient considérables, si l'on se réfère aux chiffres qui sont souvent avancés dans certaines déclarations [14].

Comme l'a relevé Dr Lee Jeng Wook Directeur Général de l'OMS << la lutte contre les médicaments de qualité inférieure ou illégaux est plus importante que jamais. Nous nous trouvons dans une situation où un meilleur accès à des médicaments sûrs et efficaces contre le Sida et d'autres maladies n'est plus une option mais une nécessité absolue>> [8].

Le Mali, pays d'environ 1 241 200 Km<sup>2</sup> avec plus de 11 millions d'habitants, est situé au cœur de l'Afrique de l'Ouest.

Depuis la dévaluation du franc CFA, le Mali s'est engagé dans une politique de promotion de médicaments génériques et la promotion de médicaments traditionnels. Avec la pandémie du sida, les besoins en antirétroviraux (ARV) sont devenus de plus en plus importants. Cet important marché a entraîné l'augmentation du nombre de fabricants opérant souvent au mépris des droits de la propriété intellectuelle, ce qui aura pour conséquence la disponibilité d'une large gamme d'ARV sur le marché international. Sous la pression des associations des personnes vivant avec le VIH/Sida (PV VIH/sida), les pays aux ressources limitées se sont lancés à la recherche de médicaments moins chers mais aussi avec le risque d'achat de médicaments de qualité médiocre. Les conséquences qui en découlent sont un traitement inefficace, un risque d'émergence de souches résistantes etc.

Dans le cadre de la lutte contre le sida, le Mali s'est doté d'un plan d'action appelé Initiative Malienne d'Accès aux Antirétroviraux (IMAARV) mis en place en 2001. Le but de l'IMAARV est la prise en charge de malades infectés par le VIH/Sida. Pour atteindre cet objectif, le Mali s'est ouvert au marché des médicaments génériques en dénomination commune internationale (DCI) provenant de partout dans le monde.

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

Le Laboratoire National de la Santé (LNS), Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique a pour mission de contrôler la qualité des médicaments, des boissons ou toutes autres substances importées ou produites en République du Mali et destinées à des fins thérapeutiques, diététiques ou alimentaires en vue de la sauvegarde de la santé des populations humaines et animales.

A ce titre, il est chargé de :

- donner son avis technique pour l'autorisation ou l'interdiction de l'usage de tout produit médicament, aliment, ou boisson à usage thérapeutique, diététique ou alimentaire ;
- prélever et analyser des échantillons dans toute unité de production, d'importation, de distribution, de conservation de médicaments, eaux, boissons diverses, aliments et toutes autres substances introduites dans l'organisme humain et animal dans le but thérapeutique, nutritionnel ou autre et concourant à l'amélioration ou la détérioration de l'état de santé de l'homme et de l'animal ;
- participer à la formation universitaire et post universitaire ;
- entreprendre des activités et recherches scientifiques et techniques ;
- contribuer à l'élaboration des normes et veiller à leur application.

De nos jours, aucune étude n'ayant été réalisée au Mali sur le contrôle de qualité des médicaments antirétroviraux (ARV), nous nous sommes proposé d'entreprendre ce travail avec comme objectifs :

### **1.1 Objectif général :**

Contribuer au contrôle de qualité des médicaments ARV utilisés au Mali.

### **1.2 Objectifs spécifiques :**

- Identifier les paramètres majeurs de contrôle de qualité de certains ARV ;
- mettre au point des méthodes d'analyse pour évaluer la qualité des médicaments ARV ;
- Etablir pour chaque médicament ARV inclus dans l'étude un protocole de contrôle de qualité.

## **II. GENERALITES**

### **2.1 Rappel sur le Syndrome d'Immuno Déficience Acquise (SIDA)**

#### **2.1.1 Définition**

Le sigle du syndrome d'immunodéficience acquise désigne une affection contagieuse grave transmise surtout par les rapports sexuels, et par le sang (transfusions, seringue non stérile, plaies etc.....)

#### **2.1.2 Rappel sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH):**

Un virus est une particule biologique simple, comprenant du matériel génétique entouré d'une coque protéique : la capside ; renfermant également diverses enzymes, et parfois entourée d'une enveloppe.

Un virus est incapable de se reproduire ailleurs qu'au sein d'une cellule vivante. Il doit s'intégrer au sein du patrimoine génétique de la cellule infectée et la forcer à fabriquer de nouvelles particules virales.

Le VIH est un rétrovirus de la famille des rétrovirales ; c'est un virus à ARN. De ce fait il a besoin de s'intégrer dans le génome humain, de se transcrire en ADN. Cette opération est permise par une enzyme virale : la transcriptase inverse. Une fois que l'ADN pro virale est intégré à l'ADN cellulaire, il pourra commencer à faire fabriquer de nouvelles matières virales : les virions et les protéines virales : capsides, ARN et enveloppe [1].

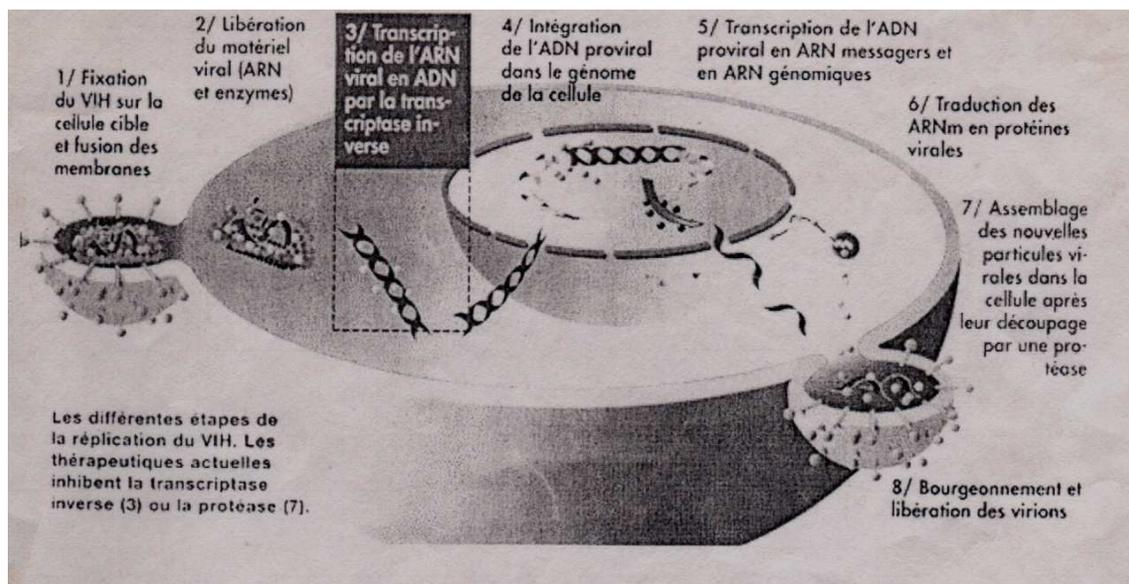
#### **2.1.3 Rappel physiopathologique de l'infection par le virus:**

L'infection des cellules cibles commence par l'adhésion du VIH à leur surface. Cette adhésion se fait par l'intermédiaire des glycoprotéines de l'enveloppe du virus et leurs récepteurs spécifiques (molécules CD4) associés à d'autres co-récepteurs (molécules CCR5 et CXCR4, récepteurs de chemokines), situés sur les cellules cibles. Cette étape est suivie de la pénétration de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule après fusion entre membrane cellulaire et enveloppe virale.

Une fois à l'intérieur, l'ARN viral est transformée en ADN pro viral à partir des nucléosides triphosphates de la cellule hôte. Cette étape appelée transcription inverse est catalysée par une ADN polymérase ARN dépendante ou transcriptase reverse ou inverse (TI ou TR) caractéristique des rétrovirus. L'ADN pro viral ainsi formé est intégré au matériel génétique de la cellule cible sous l'action de l'intégrase

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

du VIH. L'ADN pro viral intégré est transcrit en protéines, parmi celles-ci les protéines de la nucléocapside de la matrice et les enzymes de réplication (réserve transcriptase, protéase, intégrase) sont synthétisées sous forme d'un seul polypeptide qui dérive d'un gène polycistronique du VIH. La séparation de ce polypeptide est nécessaire à la constitution de nouvelles particules virales infectieuses. Cette séparation qui a valeur de maturation, est assurée par la protéase virale qui procède au clivage séquentiel du polypeptide. Les protéines et d'autres ARN messagers sont assemblés pour former les nouveaux virions. Ceux-ci sont libérés par bourgeonnement à travers la membrane cellulaire. Le cycle dure 48 heures et le virus se multipliant activement génère des milliers de particules virales prêtes à infecter de nouvelles cellules [12].



**Schéma 1** : Sites d'action des ARV [3]

## 2.2 Situation Epidémiologique du VIH/Sida au Mali

### a. Prévalence du VIH par sexe et par région

Selon l'EDS III – 2001, le taux de prévalence du VIH était de 1,7% au Mali, de 2,0% chez les femmes et de 1,3% chez les hommes. Ce taux varie selon les localités ; le district de Bamako avait le niveau le plus élevé avec 2,5% contre 0,7% pour les régions de Gao, Tombouctou et Kidal.

**b. Prévalence du VIH par sexe et par âge selon l'EDS III- 2001**

Pour les tranches 15 –19 ans et 20 – 34, le taux de prévalence du VIH a augmenté, passant de 0,8 % à 3,5 %. Dans les tranches d'âge de 30 – 34 ans et 40 – 44 ans, on constate une baisse avec un niveau de 1,5% entre 40 – 44 ans. A partir de 40 – 44 ans, le taux ne varie pas.

Chez les hommes, le niveau est élevé aux âges suivants : 30 – 34 ans (3,8%) et 45 – 49 ans (2,3%). Chez les femmes, le niveau est élevé entre 25 – 32 ans.

**c. Prévalence globale du VIH par région et selon les groupes vulnérables (EDSIII- 2001).**

Le niveau global (1,7%) cache une grande disparité si l'on fait une répartition par groupe à risque. En effet, à Bamako la prévalence du VIH atteint 23,4% chez les professionnels du sexe, 1,3% chez les vendeuses ambulantes, 7,0% chez les coxeurs et 6,3 % chez les routiers.

Le niveau le plus élevé observé par groupe à risque est le suivant :

- 49 % chez les professionnels du sexe à Ségou,
- 8,3 % chez les coxeurs à Sikasso,
- 6,7 % chez les routiers à Sikasso,
- 17,4 % chez les vendeuses ambulantes à Gao.

**2.3 Rappel sur les anti rétro viraux**

**2.3.1 Définition:**

Les antirétroviraux ARV constituent un groupe de médicaments anti-infectieux, anti-viraux, actifs sur les virus du syndrome de l'immunodéficience acquise (VIH 1 et VIH2), il s'agit de médicaments essentiellement virustatiques qui agissent par inhibition enzymatique [22].

**2.3.2 Classifications pharmacologique et chimique : [5]**

**a. Classification pharmacologique :**

Selon le mode d'action on distingue deux grandes familles d'anti-rétros viraux :

- Les inhibiteurs de la transcriptase reverse, qui comprennent les inhibiteurs nucléosidiques (INTR) et les inhibiteurs non nucléosidiques ;
- Les inhibiteurs de la protéase (IP).

**b. Classification chimique :**

Selon la structure chimique, nous avons :

- Les analogues de la thymine:  
Stavudine, 2'3' didéhydro 2'3' didésoxy thymidine.  
Zidovudine 3' azido 2'3'didésoxy thymidine.
- Les analogues de la cytidine  
Lamivudine, 2'3' didésoxy 3' thiacytidine
- Les analogues de l'inosine  
Didanosine; 2'3' didésoxy inosine
- Les analogues de l'adénine  
Abacavir

**2.3.3 Mécanisme d'action:**

**a. Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase reverse (INTR):**

Les INTR sont des analogues des bases nucléosidiques nécessaires à la synthèse protéique, ce sont des 2'3'didésoxy nucléosides. Une fois phosphorylés par les enzymes cellulaires, ils inhibent par compétition l'incorporation des bases naturelles dans l'ADN pro viral.

Ils sont incorporés dans la synthèse ; mais ne possédant pas de groupement hydroxyle (OH) en 3', ils arrêtent la prolongation de la chaîne d'ADN en empêchant l'addition de nouveaux nucléosides [1].

**b. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase reverse :**

Ils agissent sur le site allostérique de la transcriptase inverse, ils modifient la configuration du site actif et le rendent inapte à remplir sa fonction de polymérase : ce qui arrête la formation de l'ADN pro viral. Ces molécules sont actives uniquement sur la transcriptase du VIH1 [10].

**c. Les inhibiteurs de la protéase (ou anti-protéases):**

Les IP inhibent l'action catalytique de la protéase sur la maturation des virions infectieux, il en résulte la formation de virions immatures et non infectieux.

Leur efficacité a été prouvée en association avec les INTR dans les tri-thérapies antirétrovirales [12].

### **2.3.4 Approvisionnement [2] :**

La première commande en ARV de l'initiative malienne d'accès aux antirétroviraux (IMAARV) date du 15 juin 2001.

Elle a été faite par la Pharmacie Populaire du Mali (PPM), par commande directe selon les accords signés entre les firmes pharmaceutiques et l'Etat malien à travers le Ministère de la santé.

La PPM, livre les ARV aux différents sites retenus pour le suivi des malades sans marges bénéficiaires.

L'approvisionnement en ARV est organisé de façon différente dans le secteur public et dans le secteur privé.

#### **a. Secteur public :**

Il est représenté par les sites d'accès aux ARV. La PPM livre directement aux sites, après estimation de leurs besoins

Les problèmes rencontrés sont des ruptures de stock, dues à la mauvaise maîtrise dans l'expression des besoins au niveau des sites de prise en charge des malades.

#### **b. Secteur Privé.**

Le secteur privé est représenté par les centrales pharmaceutiques privées et les officines privées avant la mise en place de l'IMAARV en juin 2001.

Les ARV sont vendus avec marges bénéficiaires et à des coûts non réduits (très élevés) => 50 à 60 000 F CFA/ mois.

Mais depuis la signature de l'accord entre l'Etat et les firmes pharmaceutiques, les centrales de la place (Laborex, Copharma) se sont engagées à vendre les ARV au prix coûtant aux pharmacies qui se sont engagées à leur tour de les céder au prix coûtant sans marges bénéficiaires.

A ce niveau, les ruptures de stock sont dues à l'instabilité de la demande, le problème de gestion du temps pour le pharmacien car lui seul est habilité à faire la délivrance.

### **2.3.5 Forme pharmaceutiques des médicaments ARV disponibles au Mali**

Les antirétroviraux, disponibles au Mali dans le cadre de l'IMAARV sont représentés dans le tableau suivant :

**Mise au point des méthodes de dosage et d'Identification des ARV**

**Tableau 1 : liste des médicaments ARV disponibles au Mali à la date du 28 juillet 2004**

DÉSIGNATION	DOSAGE	FORME	CONDITIONNEMENT
Zidovudine (AZT)	300 mg	Comprimé	B / 60
	250 mg	Gélule	B / 40
	50 mg / 5ml	Sirop	Flacon
Lamivudine (3TC)	150 mg	Comprimé	B / 60
	5 ou 10 mg / ml	Sirop	Flacon
Stavudine (D4T)	30 - 40 mg	Gélule	B / 60
	200 mg	Poudre orale	Flacon
Zidovudine+ lamivudine (AZT + 3TC)	300mg + 150 mg	Comprimé	B / 60
Efavirenz (EFV)	200 mg	Comprimé	B / 90
	30 mg / ml	Solution	Flacon
	100 mg	buvable	B/60
	50 mg	Gélule	B/60
Indinavir (IDV)	400 mg	Gélule	B / 180
	400 mg	Gélule	B / 130
	400 mg	Gélule	B / 160
Névirapine (NVP)	200 mg	Comprimé	B / 60
	50 mg / ml	Suspension buvable	Flacon
Nelfinavir (NFV)	50 mg / ml	Poudre orale	Flacon
Didanosine (ddl)	50-100-150	ou	Comprimé
	200mg		Poudre
	2 ou 4 g		orale
			B / 60
			Flacon

### **2.3.6 Schémas thérapeutiques [13]**

La recherche chimique en matière de VIH a connu dans les dernières années des avancées décisives, pleines d'espoir pour l'avenir. La charge virale ou RNA VIH plasmatique constitue un outil d'évaluation des traitements antirétroviraux sans précédent.

La mono-thérapie telle qu'elle était jusqu'alors conçue avec un inhibiteur de la transcriptase inverse n'a plus de place. Certaines bi-thérapies (association de deux analogues nucléosidiques) chez les patients naïfs ou ayant déjà reçu un analogue nucléosidique associant un inhibiteur de la transcriptase inverse et une anti-protéase (essai roche NV14256) ont prouvé leur bénéfices cliniques.

Les tri-thérapies associant deux analogues nucléosidiques et un inhibiteur de la protéase (AZT + 3TC + Indinavir ; AZT + ddc + Ritonavir ; AZT + 3TC + Saquinavir) ont obtenu des effets virologiques importants, certes sur un nombre restreint de patients, mais sur une période d'évaluation qui s'allonge, supérieure ou égale à 16 mois.

L'adjonction d'une anti-protéase chez les sujets séropositifs pour le VIH et très immunodéprimés entraîne des bénéfices cliniques et des résultats viraux significatifs (essai abbott M9U247).

De nouvelles associations anti-rétrovirales, telle que la bi-thérapie ritonavir + saquinavir voient le jour.

## **2.4 Quelques définitions et notions préalables du médicament [21]**

### **2.4.1 Définitions du médicament.**

On entend par médicament, toute substance ou composition préalablement dosée présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales ;

Il peut également être défini comme tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leur fonction organique.

### **2.4.2 Composition du médicament.**

On trouve dans un médicament trois parties.

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

### ✓ Principe (s) actif (s) :

Le principe actif est une substance susceptible de prévenir ou de faire cesser un trouble déterminé de l'organisme.

### ✓ Excipients

Substance ou mélange de substances inactive par elle même sur la maladie, qui utilisée dans la formulation facilite la préparation du médicament. Il peut jouer un rôle important dans la libération du principe actif à partir du médicament et par la même modifier son activité thérapeutique.

### ✓ Conditionnement :

Il existe deux (2) conditionnements.

### ✓ Conditionnement primaire :

Indispensable pour le médicament, ayant un rôle de protection (isole et conserve le médicament), il a aussi un rôle fonctionnel (faciliter l'utilisation du médicament par le malade).

### ✓ Conditionnement secondaire :

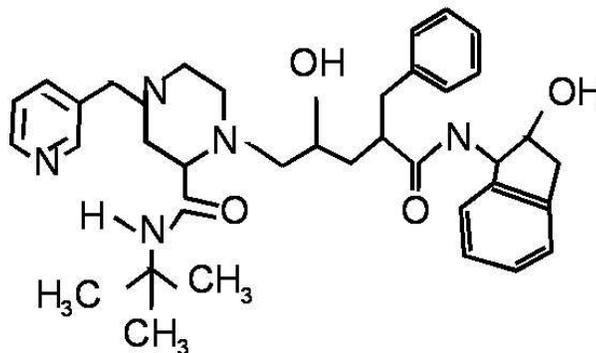
Permet la manipulation, le transport du médicament ainsi que son identification, et information pour le malade (assure la sécurité)

## 2.5 Etude monographique des neuf médicaments a r v [5]

### 2.5.1 Indinavir (I D V) :

a. Classe pharmacologique : inhibiteur de la protéase (ou anti-protéase)

b. Structures chimique:  $C_{36}H_{47}N_5O_4 \cdot H_2SO_4$



## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

**c. Présentation :** gélule à 200 ou 400 mg

**d. Posologie :**

800 mg x 3 fois/jour (toutes les 8 heures) sans aliments, mais avec de l'eau.

Ne pas diminuer la posologie (risque rapide de résistances). Passer à 600mg x 3/j s'il est associé à l'itraconazole ou en cas d'insuffisance hépatique légère ou modérée liée à une cirrhose.

**e. Interactions alimentaires et conséquences :**

Absorption rapide à jeun, diminuée de 80% par la prise d'aliment lipidique et protéique, prendre à jeun (1h avant ou après un repas)

A au moins 1 heure d'intervalle de la didanosine.

De plus : boire au moins 1,5-2 litres d'eau alcaline /j , soit 150 ml (un grand verre) à chaque prise, puis à chaque heure pendant 3h.

Ces contraintes paraissent superflues en association avec ritonavir ou nelfinavir.

**f. Bio disponibilité**

La demi vie plasmatique est de 1h 30' à 2 heures

**g. Métabolisme**

Il est métabolisé par le cytochrome P450 3A4 (dont il aussi inhibiteur).

**h. Elimination**

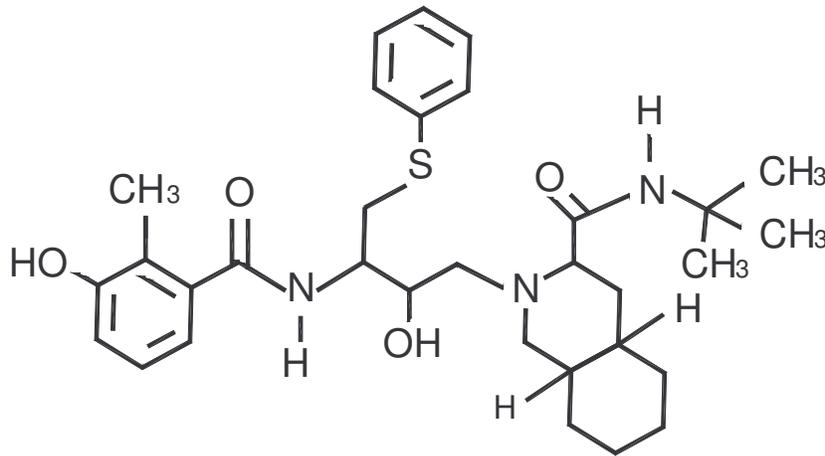
Elle est biliaire.

**2.5.2 Nelfinavir (NFV) :**

**a. Classe pharmacologique :**

Inhibiteur de la protéase

**b. Structure chimique :  $C_{32}H_{45}N_3O_4S \cdot CH_4O_3S$**



## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

### **c. Présentation : Comprimés à 250 mg,**

Poudre pour suspension orale à 50 mg / g de poudre

### **d. Posologie :**

750 mg (=3 comprimés) x 3/jour, au cours des repas.

La posologie de 250 mg x 2 / jour n'est pas validé par l'AMM (dossier non déposé juin 99)

### **e. Interactions médicamenteuses et conséquences :**

Avec des aliments, l'aire sous la courbe est multipliée par 2 à 3, quelle que soit la teneur en lipides. Donc Prendre au cours d'un repas.

### **f. Métabolisme**

Il est métabolisé par le cytochrome P 450 (3A4, 2C19, 2C9, 2D6), et est un inhibiteur du CYP 3A4.

Elimination

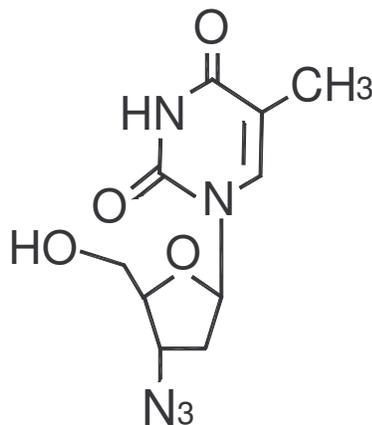
Elle est biliaire

### **2.5.3 Zidovudine (AZT).**

#### **a. Classe pharmacologique :**

Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase reverse

#### **b. Structure chimique : C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>**



#### **c. Présentation : sous forme de**

- Gélule à 100mg et 250 mg
- Comprimé à 300mg
- Solution buvable à 100mg AZT /10ml de solution
- Flacon pour perfusion à 200 mg AZT/ ml de solution

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

**d. Posologie :** 500 à 600 mg / jour en 2 ou 3 prises.

**e. Absorption :**

La zidovudine a une bonne absorption digestive (60 à 70%), elle peut être prise en dehors des repas.

**f. Bio disponibilité**

La demi vie plasmatique est égale à 3 heures.

**g. Métabolisme**

La zidovudine est métabolisée par : Glucuroconjugaison (50 à 80 %)

**h. Elimination**

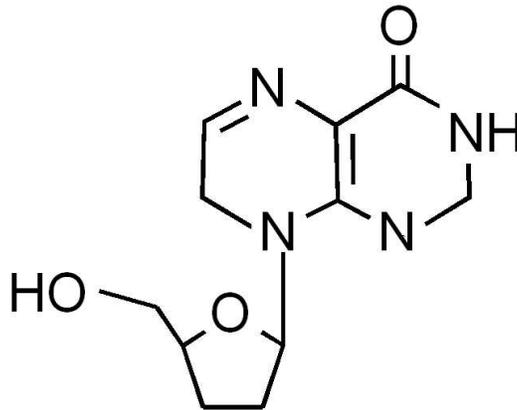
Son élimination est rénale par sécrétion tubulaire

### 2.5.4 Didanosine : [ddI]

**a. Classe pharmacologique**

Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase reverse

**b. Structure chimique :**  $C_{10}H_{12}O_3N_4$



**c. Présentation**

- Comprimés à 25,50, 100, 150 et 200 mg ;
- Poudre pour solution buvable à 2 et 4 g / Flacon

**d. Posologie**

En deux prises par jour à environ 12 heures d'intervalle ou en une seule prise / jour ; selon le poids et clairance de la créatinine :

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

Tableau 2 posologie de didanosine suivant la clairance et le poids

Clairance	Poids ≥ 60 kg	Poids < 60 kg
≥ 60 ml / mn	400 mg / j	250 mg / j
30 – 59 ml / mn	200 mg / j	150 mg / j
10 – 29 ml / mn	150 mg / j	100 mg / j
< 10 ml / mn	100 mg / j	75 mg / j

### **e. Absorption:**

L'absorption est diminuée de 50 % par l'acidité gastrique.

### **f. Bio disponibilité**

La  $\frac{1}{2}$  vie plasmatique est de 25 à 40h.

21% de concentration plasmatique du produit se retrouve dans le LCR après 1 h

### **g. Elimination**

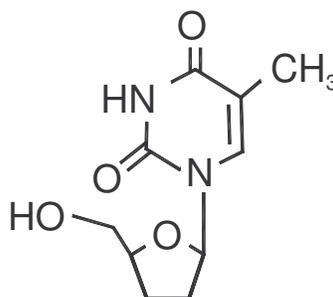
Son élimination est rénale pour 50% (excrétion tubulaire)

## **2.5.5 Stavudine (D4T)**

### **a. Classe pharmacologique**

La stavudine est un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase reverse.

### **b. Structure chimique : $C_{10}H_{12}N_2O_4$**



### **c. Présentation :**

- Gélules à 15, 20, 30, 40 mg
- Poudre pour solution buvable à 1mg de stavudine/ ml

### **d. Posologie**

La stavudine est utilisée en 2 prises à 12 h d'intervalle, selon le poids et la clairance de la créatinine.

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

Tableau 3 : Posologie de la stavudine en fonction de la clairance en créatinine et du poids

Clairance	Poids <60 kg	Poids ≥60kg
≥ 50 ml / mn	30 mg x 2 / j	40 mg x 2 / j
26 – 50 ml / mn	15 mg x 2 / j	20 mg x 2 / j
≤ 25 ml / mn	15 mg x 1 / j	20 mg x 1 / j

### **e. Absorption**

Elle se fait à 86%, mais cette absorption est un peu diminuée par les aliments.

### **f. Bio disponibilité**

La  $\frac{1}{2}$  vie plasmatique est de 3 heures 30 minutes

Dans le LCR, la concentration plasmatique est de 39% après 4 heures.

### **g. Elimination**

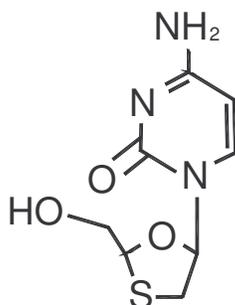
Le produit est éliminé à 40% par voie rénale sous forme inchangée (sécrétion tubulaire).

## **2.5.6 Lamivudine : [3TC]**

### **a. Classe pharmacologique**

C'est un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase reverse.

### **b. Structure chimique : $C_8H_{11}N_3O_3S$**



## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

### **c. Présentation : sous forme de**

- Comprimés de 150 mg
- Solution buvable 10 mg de lamivudine/ml de solution

### **d. Posologie selon la clairance de la créatinine :**

**Tableau 4** : Posologie de lamivudine en fonction de la clairance

Clairance	Posologie
≥ 50 ml / mn	50 mg x 2 / j
30 à 50 ml / mn	150 mg x 1 / j
15 à 50 ml / mn	100 mg x 1 / j
5 à 15 ml / mn	50 mg x 1 / j
5 ml / mn	25 mg x 1 / j

### **e. Absorption**

Le produit est absorbé de 80% à 85%.

### **f. Bio disponibilité**

La  $\frac{1}{2}$  vie plasmatique est égale à 12 heures.

Dans le LCR, 12% de la concentration plasmatique.

### **g. Elimination**

L'élimination se fait par voie rénale sous forme inchangée.

## **2.5.7 Association : Zidovudine + Lamivudine**

### **a. Classe pharmacologique**

Ce sont des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase reverse.

### **b. Présentation**

Comprimé pelliculé 300 mg de Zidovudine + 150 mg de Lamivudine

### **c. Posologie :**

1 comprimé x 2 par jour, au cours ou en dehors des repas.

### **e. Elimination**

Elle est rénale sous forme inchangée

### **f. Distribution**

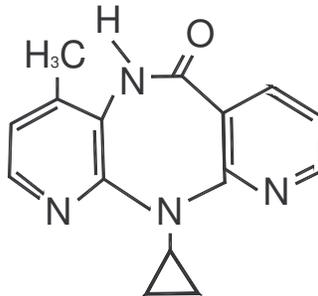
Après deux heures à 4 heures : L'AZT est à 50% et la Lamivudine à 12% de la concentration plasmatique.

### 2.5.8 Nevirapine [NVP]

#### a. Classe pharmacologique.

La Névirapine est un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase reverse.

#### b. Structure chimique : $C_{15}H_{14}N_4O$



#### c. Présentation : comprimé à 200 mg

Suspension orale 50 mg/5 ml

#### d. Posologie

Pendant les premiers jours la posologie est de 1 cp par jour. Puis elle est de 1 cp 2 fois par jour (1/12 h), sauf si un rash est survenu durant la première période ; La prise unique de 2 comprimés /jour n'est pas validée par l'AMM.

Si on observe un arrêt de plus de 7 jours : réintroduire selon même schéma.

S'il y a un oubli ; prendre la dose suivante le plus vite possible, mais ne pas doubler la prise suivante.

#### e. Absorption

La Névirapine a une bonne absorption digestive (> 20%), non modifiée par les aliments, les antiacides, la ddl. Elle peut donc être prise pendant ou en de hors des repas.

#### f. Bio disponible

La  $\frac{1}{2}$  vie plasmatique est égale à 25-30 heures.

#### g. Métabolisme

Il est réalisé par le cytochrome P 450 (dont elle est inductrice).

#### h. Elimination

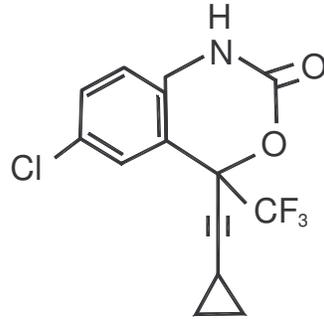
Elle est à 80% urinaire (métabolites glycoconjugués, forme inchangée <5%), 10% fécale.

### 2.5.9 Eavirenz (EFV)

#### a. Classe pharmacologique

C'est un inhibiteur non nucléidique de la transcriptase reverse

#### b. Structure chimique : $C_{14}H_9Cl F_3NO_2$



#### c. Présentation :

- gélules à 50, 100 et 200 mg
- Comprimés pelliculés à 600 mg

#### d. Posologie

En une seule prise, au coucher la posologie est de 600 mg (3 x 200 mg) avec ou sans aliments ;

- Ne pas ajouter à un traitement en échec, mais associer à 1 ou plusieurs nouveaux produits ;
- Ne jamais diminuer la dose, ni fractionner la prise, ni augmenter la posologie progressivement.

#### e. Absorption

Absorption peu modifiée par un repas normal, augmentée de 50% après un repas riche en lipides. Peut donc être pris avec ou sans aliments.

#### f. Bio disponibilité

La  $t_{1/2}$  vie plasmatique est de 40 à 55 heures.

#### g. Métabolisme

Il est métabolisé par le cytochrome P 450 dont il est aussi à la fois inducteur et inhibiteur

#### h. Elimination

Elle est fécale, et urinaire sous forme de métabolites glycoconjugués et sous forme inchangée.

## **2.6 Notion d'assurance de la qualité**

C'est l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les produits fabriqués sont de bonne qualité.

L'assurance de la qualité des médicaments, garantie par les bonnes pratiques de fabrication et par une surveillance ultérieure de la qualité jusqu'à l'utilisation, est déterminante pour tout programme portant sur les médicaments essentiels [15].

## **2.7 Notion de contrôle de qualité**

<<La qualité est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui donne l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés du client.>>

La qualité d'un médicament revêt plusieurs aspects.

L'usage sûr et efficace des médicaments dépend premièrement de leur qualité et deuxièmement de leur utilisation [3].

La désignation « qualité » appliquée à un médicament exige :

- Qu'il contienne la qualité et la quantité de chaque principe actif inscrit sur l'étiquette dans les limites applicables de ces spécifications :
- Qu'il contienne la qualité et la quantité de chaque dose unitaire ;
- Qu'il soit exempt de substances étrangères ;
- Qu'il maintienne son dosage, sa bio disponibilité, son apparence jusqu'à l'utilisateur;
- Qu'après administration, il libère le principe actif avec une entière disponibilité.

L'objectif principal du contrôle de qualité est d'étudier les normes pour les propriétés du produit, d'évaluer les résultats et de rejeter les produits qui n'atteignent pas les normes [6].

### **2.7.1 Examen visuel :**

#### **✓ Principe**

Retirez au moins 20 comprimés de leur conditionnement et examinez-les visuellement.

Ils ne doivent pas être endommagés, la surface doit être lisse et généralement de couleur uniforme. Une instabilité physique peut se manifester par les signes suivants :

- Présence de quantités excessives de poudre et ou de fragments de comprimés au fond du récipient (provenant de comprimés, érodés, écrasés, ou brisés) ;

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

- Fissures, décalottage ou laminage de la surface ou de l'enrobage, gonflement, marbrures, coloration anormale, adhérence entre les comprimés ;
- Présence de cristaux sur les parois du récipient ou sur les comprimés ;

### **2.7.2 Contrôle de l'étiquette**

Toutes les préparations pharmaceutiques doivent être conformes aux normes d'étiquetage spécifiées dans les bonnes pratiques de fabrication.

Les indications suivantes doivent figurer sur l'étiquette du récipient :

**a. Nom du médicament :**

**b. Nom du ou des principe (s) actif (s) :**

Chaque fois que possible on adoptera la dénomination commune internationale (D C I) ;

**c. Quantité du ou des principes actifs présents dans chaque comprimé :**

**d. Nombre de comprimés dans le récipient :**

**e. Numéro de lot attribué par le fabricant :**

**f. Date de péremption, s'il y a lieu, date de fabrication :**

**g. Eventuellement, conditions particulières de conservation ou précautions à prendre lors de la manipulation :**

**h. Mode d'utilisation, avertissements et précautions d'emploi, le cas échéant :**

**i. Nom et adresse du fabricant et éventuellement de la structure responsable de la mise sur le marché :**

### **2.7.3 Essais**

#### **2.7.3.1 Uniformité de masse**

✓ **Comprimés :**

Les comprimés non enrobés et les comprimés pelliculés qui contiennent au moins 5% de principe actif, doivent satisfaire à l'essai d'uniformité de masse.

✓ **Mode opératoire recommandée :**

Pesez 20 comprimés et calculez la masse moyenne.

L'écart entre la masse de chaque comprimé pesé isolément et la masse moyenne ne doit pas dépasser les limites indiquées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 5** : Masse moyenne et écart pour les comprimés. (%)

Masse moyenne des comprimés	Ecart
Moins de 80 mg	±10
80 mg à 250 mg	±7,5
Plus de 250 mg	±5

✓ **Capsules :**

Pesez une capsule pleine sans perdre de fragment de l'enveloppe, ouvrez la capsule et videz-la complètement que possible. Pesez l'enveloppe et calculez la masse du contenu par différence. Répétez l'opération sur 12 autres capsules [21].

La masse moyenne ne doit pas dépasser les limites indiquées ci-dessous :

**Tableau 6** : Masse moyenne et écart pour les capsules (%).

Masse moyenne	Ecart
Moins de 300 mg	±10
300 mg et plus	±7,5

**2.7.3.2 Volume moyen**

C'est un essai qui concerne les sirops, les injectables et les suspensions. On prend une éprouvette graduée et on transfère le contenu d'au moins de deux flacons puis lire le volume correspondant sur le cylindre. Faire la moyenne qui ne doit pas dépasser ±,5% du volume indiqué sur l'étiquette.

**2.7.3.3 Test de désagrégation :**

Cet essai est destiné à déterminer l'aptitude des comprimés et des capsules à se désagréger en milieu liquide dans le temps prescrit lorsqu'ils sont placés dans les conditions expérimentales spécifiées.

La désagrégation est considérée comme complète lorsqu'il ne reste plus de résidu sur la grille de l'appareil, à l'exception de fragments d'enrobage ou d'enveloppes de capsules ou, s'il subsiste un résidu, lorsque ce dernier est constitué seulement par une masse molle ne comportant pas de noyau palpable et non imprégné [19].

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

Cet essai ne concerne pas les comprimés à croquer ni les comprimés vétérinaires.

Le temps de désagrégation doit être pour :

- Les comprimés enrobés, inférieur ou égale ( $\leq$ ) à 60 min ;
- Les comprimés non enrobés, inférieur ou égale ( $\leq$ ) à 15 min ;
- Les comprimés pelliculés, inférieur ou égale ( $\leq$ ) à 30 min ;
- Les gélules, inférieur ou égale ( $\leq$ ) à 30 min

### **2.7.3.4 Détermination du pH**

Le pH est un nombre caractéristique d'une solution : Il représente par convention son acidité ou son alcalinité [18].

## **2.8 Système OMS de certification**

Ce système est destiné à permettre aux pays importateurs d'obtenir des autorités compétentes des pays exportateurs une confirmation officielle du fait que les produits pharmaceutiques importés avaient bien obtenu l'autorisation de mise sur le marché dans le pays d'origine.

Ces autorités doivent aussi confirmer que les fabricants sont soumis à des contrôles réguliers et que les conditions de fabrication sont conformes aux bonnes pratiques de fabrication recommandées par l'OMS [21].

## **2.9 Normes de qualité**

Ces spécifications comportent un ensemble de normes judicieusement choisies et assorties de méthodes d'analyse, pouvant être utilisées pour évaluer l'intégrité des médicaments ou formes pharmaceutiques et des matières premières. Pour s'assurer de l'uniformité de tous les lots d'un médicament présenté sous une ou plusieurs formes, il est nécessaire d'établir une norme appropriée pour l'identité, la pureté, la teneur, le comportement norme et d'autres caractéristiques. C'est le respect de ces normes qui permet d'obtenir une qualité souhaitée [16]. Elles sont soit publiées, soit confidentielles.

## **2.10 Notion générale sur le spectrophotomètre UV/Visible et la chromatographie sur couche mince (CCM).**

### **2.10.1 Rappel théorique sur le spectrophotomètre UV/visible**

#### **2.10.1.1 Principe du spectrophotomètre**

La méthode analytique spectrale ou spectroscopie consiste d'une manière générale soit à obtenir et à analyser l'image d'un faisceau de radiation électromagnétique après leur action sur le corps à analyser, soit à analyser les radiations produites par une substance après excitation.

Les radiations électromagnétiques sont essentiellement caractérisées par l'une ou l'autre des paramètres suivants :

- La longueur d'onde ( $\lambda$ ) = C'est la longueur d'une onde ;
- Le nombre d'onde ( $\sigma$ ) = C'est le nombre d'onde par unité de longueur ;
- La fréquence ( $\nu$ ) = C'est le nombre de vibrations par unité de temps.

Ces paramètres sont liés entre eux par les relations suivantes :

$$\nu = \sigma = 1/\lambda$$

$$\lambda \cdot \mu = C_0/\mu$$

Où

$C_0$  = vitesse de la lumière dans le vide

Et  $\mu$  = indice de réfraction du milieu traversé.

La longueur d'onde est exprimée généralement en nanomètre (nm), micromètre ( $\mu\text{m}$ ) ou en Angström ( $\text{A}^\circ$ ).

L'unité du nombre d'onde est le Kaiser (K) on peut aussi utiliser le  $\mu\text{m}^{-1}$ .

La fréquence est exprimée généralement en Hertz (Hz), en mégacycle/s ou en mégahertz (MHz).

Dans la spectroscopie UV la mesure de l'absorption est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser qui se trouve sous forme d'atome.

Ces atomes à l'état fondamental absorbent de l'énergie lumineuse de longueur d'onde bien déterminée pour passer à l'état excité.

Un faisceau lumineux de longueur d'onde bien déterminée traverse la solution contenant l'élément à doser.

De la proportion intensité lumineuse absorbée par la solution, on déduit la concentration de la solution absorbante.

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

Cette méthode fait intervenir les propriétés moléculaires mettant en jeu les électrons qui participent aux liaisons chimiques.

Son principe est basé sur la loi de Beer Lambert



Cette loi s'exprime par la relation suivante.

$$A = \text{Log}_{10}(1/T) = \text{Log}_{10}(I_0 / I)$$

$$T = I/I_0$$

$$A = \epsilon L c$$

Où

$I_0$  = Intensité du rayonnement monochromatique incident ;

$I$  = Intensité du rayonnement monochromatique transmis ;

$\epsilon$  = Coefficient d'extinction molaire;

$c$  = Concentration de la solution ;

$L$  = Longueur de la cuve contenant la solution [17].

L'absorbance  $A$  de la solution considérée peut alors s'écrire :

$$A = \text{Log}_{10}(I_0/I)$$

Cette absorbance est aussi appelée densité optique et notée DO.

Elle est proportionnelle à la longueur parcourue par le faisceau à travers la solution appelée trajet optique ainsi qu'à la concentration de la solution.

### **2.10.1.2 Applications analytiques**

Elles concernent l'application qualitative et quantitative de la spectrophotométrie UV.

- Application qualitative

Elle se résume à l'identification d'une substance par spectrophotométrie UV visible.

L'identification d'une substance peut être faite par l'étude de son spectre visible.

Dans ces conditions on tâchera de minimiser les interactions du solvant pour avoir les bandes d'absorption les plus fines possibles.

- Application quantitative : Elle repose sur les lois de Beer- Lambert  $DO = A = \epsilon LC$

En pratique on choisit les mesures à la longueur d'onde maximale ( $\lambda_{Max}$ ) .

En analyse courante les applications sont nombreuses dans les domaines pharmaceutiques et biochimiques.

On opère généralement par comparaison à une gamme d'étalonnage ou un étalon.

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

Si l'étalon n'existe pas on peut faire le dosage à partir du coefficient d'extinction moléculaire ou spécifique.

Il faut se souvenir que celui ci n'est valable que pour un solvant donné. Si le composé est seul à absorber à la longueur d'onde choisi, les calculs sont simples, mais si le composé est en mélange avec un autre corps qui absorbe également les mesures sont faites à deux longueurs d'ondes différentes.

### **2.10.1.3 Description du spectrophotomètre**

Un spectrophotomètre est composé de trois éléments principaux :

- Un émetteur ;
- Une cellule de mesure ;
- Un analyseur ;

#### **a. L'émetteur :**

Est constitué d'une lampe qui produit le rayonnement lumineux et d'un Monochromateur qui « filtre » la lumière pour ne laisser passer qu'une lumière monochromatique.

Il y a généralement deux lampes : une lampe à hydrogène ou à deutérium dont le spectre va de 120 nm à 400 nm et une lampe à filament de tungstène ou à vapeur d'halogène dont le spectre va de 350 nm à 900 nm. L'association de ces deux lampes permet donc de couvrir tout le spectre du proche UV au visible. Le monochromateur est un système (prisme ou réseau) qui permet de sélectionner à partir d'une lumière poly chromatique, une longueur d'onde déterminée.

#### **b. L'analyseur :**

Est composé d'un système qui permet de transformer un signal lumineux en un signal électrique, lui même converti en valeur numérique lue sur le cadran de mesure.

#### **c. La cellule d'analyse :**

Est un système qui permet d'intercaler sur le trajet du Faisceau lumineux les échantillons à étudier. L'élément principal est une cuve en verre ou en quartz dont le modèle le plus courant est un parallélépipède à base carrée de 1 cm de trajet optique ayant deux faces opposées parfaitement parallèles et transparentes et deux faces dépolies. La manipulation des cuves se fait toujours par les faces dépolies.

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

Le spectrophotomètre doit avoir une sortie pour le branchement d'un enregistreur afin de pouvoir enregistrer les spectres d'absorption [9].

**NB<sub>1</sub>** : Ne jamais utiliser de cuve en verre dans la région du spectre UV pour la raison que le verre absorbe en UV/Visible.

### **2.10.2 Chromatographie sur couche mince (CCM) [17]**

La séparation chromatographique est basée sur la différence de séparation d'un soluté entre une phase mobile et une phase stationnaire.

Dans la chromatographie sur couche mince, la phase stationnaire est constituée d'une fine couche (0,20 mm en général) de substance séchée (gel de silice, kieselgur, alumine, cellulose, ... ; ) déposée sur un support (plaque de verre d'aluminium ... ;)

La phase mobile est constituée par un solvant ou un mélange de solvant qui migre le long de la plaque. Cette migration ou développement s'effectue dans une chambre à chromatographie qui est généralement en verre afin de permettre une visualisation de la progression du solvant.

La chromatographie n'était qu'une méthode de séparation, il faut lui adjoindre une méthode de détection afin de permettre une identification des produits séparés.

La détection de produit incolore peut s'effectuer de différentes manières :

- Soit par pulvérisation d'un réactif adéquat ;
- Soit par utilisation des plaques pré imprégnées avec un indicateur de fluorescence.

Là où se trouvent les substances, il apparaît une tache interne sous lumière UV.

Lorsqu'on utilise la chromatographie sur couche mince pour identifier un produit, on peut comparer le chromatogramme obtenu avec la solution du produit à examiner et celui obtenu avec la solution étalon du même produit. Si on obtient le même spot dans les deux cas, on peut supposer qu'il s'agit de la substance. Il est pratique également de définir le R<sub>f</sub> qui correspond au rapport de la distance parcourue par la substance sur la distance parcourue par phase mobile (front de migration); la mesure s'effectuant à partir du point de dépôt.

La chromatographie sur couche mince permet également la détermination semi-quantitative de produit en solution en comparant l'intensité.

## **2.11 Validation analytique [7].**

Une procédure analytique validée est une procédure analytique dont l'exactitude et la variabilité ont été démontrées et documentées, que son biais statistique est connu et que sa spécificité, sa fidélité et sa sensibilité sont établies et notamment, que ces interférences ont été identifiées.

Selon le concept européen dont les critères diffèrent tant soit peu des critères américains (critères CEE et USP XXII<sup>e</sup> édition), le but de la validation d'une procédure d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue.

### **2.11.1 Les critères de la validation**

#### **2.11.1.1 La sélectivité**

Une méthode est dite sélective lorsque, appliquée à n constituants, elle peut se décomposer en n méthodes indépendantes susceptibles d'évaluer chacun des n constituants [7].

#### **2.11.1.2 La spécificité**

Elle varie suivant la rubrique : essai, identification, et dosage.

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupe fonctionnel d'une ou plusieurs substances présentes dans l'échantillon [7].

#### **2.11.1.3 La fidélité**

Elle exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans les conditions précises. Dans la pratique l'évaluation de la fidélité se fait par répétabilité et la reproductibilité [7].

##### **a. Répétabilité**

C'est la détermination de l'écart type relatif et l'appréciation de l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil de 95% de sécurité.

Il s'agit de calculer à partir d'une population supérieure ou égale à six (6) résultats, l'écart type provenant de la racine carrée de la moyenne des variances des résultats de plusieurs mesures [7].

## **b. La reproductibilité**

C'est la précision de la méthode lorsqu' elle est appliquée dans des conditions différentes généralement dans des laboratoires différents à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser. La comparaison des résultats obtenus par différentes analyses, avec un matériel différent, ou à des dates différentes, peut aussi fournir des informations précieuses à cet égard [4].

### **2.11.1.4 L'exactitude (ou justesse)**

Elle correspond à l'écart de l'accord entre la valeur qui est acceptée, soit comme valeur conventionnelle (étalon de référence), soit comme valeur de référence (étalon international) et la moyenne, qui est obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois[7].

### **2.11.1.5 La linéarité**

C'est la capacité à l'intérieur d'un certain intervalle à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. Elle s'exprime traditionnellement par la pente de la régression [7].

.

### **2.11.1.6 La sensibilité**

Elle est la capacité de la procédure d'analyse à enregistrer de faibles variations de la concentration [7].

### **2.11.1.7 La robustesse**

Selon la 22<sup>eme</sup> édition de la Pharmacopée américaine, c'est la capacité d'une procédure analytique à rendre les résultats valables en présence de modifications limitées des conditions expérimentales [7].

### **2.11.1.8 Seuil de détection**

Il est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans l'échantillon pouvant être détectée mais non quantifiée comme valeur exacte [7].

### **2.11.1.9 Seuil de quantification**

Il est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans l'échantillon pouvant être dosé dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies [7].

Au terme de ces différents paramètres et dans le cadre de la validation de nos procédures d'analyses, nous avons retenus de par nos moyens limités les critères ci dessous :

- Linéarité ;
- Répétabilité ;
- Reproductibilité ;
- Sensibilité ;
- Spécificité ;
- Le seuil de détection.

### **III. METHODOLOGIE GENERALE DE L 'ANALYSE**

#### **3.1 Type et lieu d'étude**

Notre étude a porté sur neuf molécules antirétrovirales à savoir :  
La Zidovudine, la lamivudine, la stavudine, l'indinavir, le nelfinavir, l'efavirenz, la didanosine, la nevirapine et l'association Zidovudine + lamivudine.  
L'étude a été effectuée au Laboratoire National de Santé du Mali.

#### **3.2 Échantillonnage**

L'échantillonnage s'est déroulé en fonction du programme d'activité du LN S.  
Les échantillons ont été prélevés au niveau de l'Hôpital Gabriel Touré (HGT), du Centre d'Ecoute, de Soins, d'Animation et de Conseil (CESAC), et suivant les appels d'offres de la Pharmacie Populaire du Mali (PPM) et les médicaments soumis à la demande d'AMM de la Direction de la Pharmacie et du médicament (DPM)

#### **3.3 Critères d'inclusion :**

L'étude s'est effectuée sur les neufs molécules sous leurs différentes formes galéniques: gélules, comprimés, poudre pour solution buvable, Sirop, suspension buvables.

#### **3.4 Critères d'exclusion :**

Ils concernent les molécules autres que les neufs (9) molécules (ARV) et les formes autres que les formes citées ci dessus.

#### **3.5 Traitement des données**

Les données sont traitées à l'aide des logiciels Word et Excel.

#### **3.6 Plan analytique**

##### **3.6.1 Méthodologie générale de la mise au point :**

Notre étude s'est déroulée en trois étapes :

##### **✓ Première étape :**

Elle a été consacrée à la recherche bibliographique sur les différents paramètres de dosage et d'identification des molécules ARV, ce qui nous a permis de définir les objectifs et de dégager le plan analytique de l'étude.

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

### **✓ Deuxième étape :**

Elle a concerné les différents paramètres de dosage et d'identification des molécules. Il s'est agi pour le dosage, de la recherche des différentes longueurs d'onde maximales et d'absorbances spécifiques et pour l'identification des molécules, de la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), des tests de coloration et les spectres à l'UV/visible.

### **✓ Troisième étape :**

Elle a consisté à la validation sur les matières premières de chacune des molécules. Cette étape a été faite suivant certaines caractéristiques de la validation des méthodes analytiques. Compte tenu de nos moyens, ces caractéristiques ont porté sur la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, la sensibilité, la spécificité et le seuil de détection. En plus de ces caractéristiques, des études ont été faites sur la stabilité des molécules dans les solutions durant 72 heures de stockage à la température ambiante, ainsi des essais ont été effectués sur les solutions aux jours J1, J2, J3 pour mieux apprécier la stabilité des molécules en solution sur la longueur d'onde, les spectres et les absorbances spécifiques.

L'objectif de cette validation était de s'assurer que les méthodes analytiques données donneront des résultats suffisamment fiables et reproductibles. Il s'agissait de :

- Déterminer la possibilité d'interférence des excipients au cours de l'identification et du dosage (effet matrice) ;
- Vérifier l'absorbance spécifique et la longueur d'onde maximales obtenues avec les produits finis pour chaque molécule ;
- Comparer les spectres pour chaque molécule par rapport à la substance de référence ;
- Vérifier les spots obtenus à la CCM des différents molécules, et les colorations obtenues lors des différents tests de colorations pour chaque molécule ;
- Vérifier la stabilité des molécules dans les solutions de dosage ;

Vérifier la répétabilité, la linéarité la sensibilité la reproductibilité des méthodes d'analyse.

Pour mener à bien notre étude, les échantillons utilisés sont des produits finis de nature spécialité obtenus de l'Hôpital Gabriel Touré, du CESAC, de la Direction de la Pharmacie et du Médicament (DPM).

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

Les substances de référence ou matière première utilisées dans la validation sont obtenues des firmes pharmaceutiques.

Les solvants et les réactifs utilisés sont de nature pour analyse. Ils sont de grade HPLC pour les analyses à l'HPLC ou de grade UV pour les analyses à UV.

Les méthodes ainsi validées ont été utilisées pour doser et identifier d'autres échantillons, au total 62 échantillons dont 59 sont analysés au spectrophotomètre et 3 par la chromatographie liquide haute performance.

### **a. Dosage :**

Nous l'avons effectué au spectrophotomètre ultra violet/visible sur huit molécules (Didanosine, Efavirenz, Indinavir, Lamivudine, Nelfinavir, Nevirapine, Stavudine, Zidovudine) et par la chromatographie liquide haute performance pour l'association Zidovudine+ Lamivudine.

L'étude spectrophotométrique a concerné, dans un premier temps les tests de solubilité pour chaque produit, ce qui nous a conduit au choix des solvants de dissolutions.

Pour ce faire, la plupart des molécules ayant des propriétés acido-basiques, nous sommes proposés de tester les solvants organiques et inorganiques.

Ainsi les solvants utilisés pour ces différents tests de solubilité ont été: le méthanol, le propanol 2, l'éthanol, le mélange méthanol/eau dans les proportions (75/25), le mélange méthanol / eau / acetonitrile (70/20/10), la soude 0.1N dans l'eau, benzol, l'acide chlorhydrique 0,1 N.

### **b. Observation**

Nous avons constaté une bonne solubilité et un temps de dissolution plus court, pour certains solvants que pour d'autres.

Vu ces résultats, nous avons retenu pour notre dosage comme solvant de dissolution, ceux qui ont présenté une bonne solubilité et un temps de dissolution court.

Au cours des tests réalisés sur les formes sirops de Zidovudine, Lamivudine et la poudre pour suspension buvable de la stavudine, nous avons constaté un effet déplaçant les spectres à la lecture spectrophotométrique après la dissolution de la prise d'essai en sirop sans extractions. Ainsi nous avons procédé à des extractions de la matière grasse contenue dans les sirops par l'éther diéthylique.

De même pour ce qui concerne la Nevirapine suspension, nous avons procédé à une dilution primaire du produit avec la soude 0,1 N et ensuite à l'extraction du principe

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

actif par l'éther diéthylique, suivie de l'évaporation à sec de la phase étherée et la dissolution de l'extrait sec par le méthanol.

L'étude dans un second lieu a consisté à déterminer la longueur d'onde et l'absorbance maximale pour chaque molécule. Pour ce fait nous avons effectué des études suivant les différentes caractéristiques de la validation pour définir la longueur d'onde et l'absorbance d'absorption maximale de chaque molécule.

Au départ nous avons déterminé le poids moyen (comprimés, gélules) de chaque produit fini et partant de son dosage théorique nous avons fixé une concentration finale après dissolution dans le solvant adéquat.

Les poids moyens sont déterminés sur 10 comprimés ou gélules à partir d'une balance électronique. Le contenu des gélules et les comprimés est ensuite broyé dans un mortier pour obtenir une poudre très fine.

Les prises d'essai sont faites à partir de ces poudres ainsi obtenues.

### ✓ **Exemple:**

- Calcul de la prise d'essai pour un comprimé
- Peser le comprimé entier, soit  $P = 614 \text{ mg}$ ;
- Le comprimé contient théoriquement  $500 \text{ mg}$  de principe actif (P. a)
- Si la prise d'essai (PE) doit être  $10 \text{ mg}$  de principe actif, la quantité de comprimé réduit en poudre est  $(614 \times 10) / 500 = 12,28 \text{ mg}$  contenant  $10 \text{ mg}$  de principe actif.
- Calcul de la prise d'essai pour une gélule.

Il convient d'ouvrir cette dernière de la peser vide après l'avoir pesé avec son contenu. Le contenu de la gélule correspond à la différence des pesées.

Les calculs sont effectués à partir de la poudre de la gélule comme indiqué ci-dessus pour le comprimé.

Le calcul est nécessaire à chaque fois qu'il convient de déterminer la quantité de principe actif entrant dans la composition d'un médicament.

**NB<sub>2</sub>** les applications à ces différentes études sont définies dans le chapitre Applications – résultats.

La forme associée de Zidovudine + Lamivudine a été étudiée par la chromatographie liquide haute performance.

Nous nous sommes proposés d'identifier et de doser cette forme.

Pour ce faire nous nous sommes inspirés de la méthode d'identification des antiretroviraux mise au point par Guetin Claire et Karolak Sara, tous de Nationalité

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

française, du laboratoire de chimie analytique, Faculté de Pharmacie – Université Paris 11.

Nous avons travaillé en mode gradient sur les trois molécules. Ainsi, il a été utilisé pour la phase mobile, le mélange acetonitrile / tampon phosphaté à pH = 7,17 et à la proportion de 8 volume pour l'acetonitrile contre 92 volume pour la solution tampon. Le débit était de 1 ml / minute, la détection à l'UV était à la longueur d'onde de 260 nm et le volume d'injection à 10 µl .

La température de la colonne était à 37°. Les colonnes utilisées ont été le C18 avec les dimensions 4,6 mm x 25 cm et le C8 (4,6 mm x 150 mm).

L'essai a d'abord été effectué pour la première fois avec la colonne C8 suivant les conditions prédéfinies. Nous avons constaté qu'avec cette colonne la lecture était incomplète, puisque la Zidovudine n'apparaissait pas durant tout le temps de l'analyse, seule la Lamivudine apparaissait.

Ce constat nous a emmené à utiliser une autre colonne de marque C18.

Résultat : Tous les principes actifs (Zidovudine, Lamivudine) apparaissaient avec un temps de rétention et une aire proportionnelle à la concentration des deux molécules respectives.

### **b. Identification**

L'identification a été faite soit à partir d'un test de coloration, soit par spectrométrie UV/V ou par la chromatographie sur couche mince.

#### **✓ Tests de coloration :**

Ces différents tests ont été faits sur les produits finis et ensuite validés par les matières premières pour chaque molécule.

Elle consistait à mesurer une quantité de poudre ou volume de chaque molécule de l'essai équivalent à 10 mg et d'ajouter quelques gouttes de réactifs bien définis, ensuite on observe la coloration obtenue de la réaction poudre –réactif.

#### **✓ Spectrophotométrie UV/visible**

Les identifications par la spectrophotométrie UV ont été faites suivant les spectres obtenus au cours de la validation sur les matières premières de chaque molécule.

#### **✓ Chromatographie sur Couche mince**

On identifie chaque principe actif par son Rf en chromatographie sur couche mince (CCM). Pour ce faire, on s'est inspiré de la méthode de la pharmacopée européenne 4<sup>ème</sup> édition, pour l'AZT. On utilise une plaque recouverte d'un gel de silice approprié (5 x 10 cm) contenant un indicateur de fluorescence dont l'intensité est optimale à 254 nm.

### **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

On dépose séparément sur la plaque, après dissolution de 0,20 g de substance à examiner dans le diluant (Méthanol), 25  $\mu$ l de chaque solution d'essai sauf dans l'association où on a déposé 10  $\mu$ l de la solution d'essai.

Pour l'expérimentation des procédures de dosage les critères étudiés ont été :

- b. La spécificité ;
- c. La linéarité ;
- d. La répétabilité ;
- e. Le coefficient de variation ;
- f. La stabilité ;
- g. Limite de détection ;
- h. Le spectre à l'U V ;
- i. L'absorbance spécifique ;
- j. La sensibilité ;
- k. La reproductibilité.

#### **3.6.2 Méthodologie de l'expérimentation**

On trouvera ci après la liste et les indications sur la façon de déterminer les critères qui ont été spécifiés pour nos différentes méthodes analytiques.

##### **a. Stabilité :**

La stabilité des solutions de dosage est définie suivant les mesures de l'absorbance pendant 72 heures de conservation.

Au cours de cette étude sont déterminés: la longueur d'onde d'absorption de chaque molécule de l'étude, le spectre, et l'absorbance pour apprécier la stabilité.

##### **b. Répétabilité**

Cette mesure de la variation des résultats au sein du LNS caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériels, laboratoire). Elle est réalisée sur les solutions à la concentration de 0,01 mg / ml.

##### **c. Linéarité**

Elle a été définie à travers la capacité de nos différentes méthodes à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons.

Le domaine d'utilisation définissant l'intervalle entre la concentration la plus faible et la concentration la plus élevée dont on a démontré qu'elles pouvaient être

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

déterminée avec une précision, une exactitude et une linéarité acceptables a été pour chaque molécule définie entre 0,200 et 0,500 d'absorbance.

### **d. Spécificité**

La spécificité est définie pour chaque molécule suivant son spectre, sa densité optique, son Rf, et sa longueur d'onde à l'U V.

### **e. Reproductibilité**

Elle a été faite suivant, la comparaison des résultats obtenus par les différents analytes à des dates différentes.

### **f. Sensibilité**

Elle est démontrée dans l'étude consacrée sur la linéarité et se définit par la capacité de nos différentes méthodes à détecter les petites variations de la concentration. Elle est représentée par la pente de la courbe d'étalonnage.

### **g. Seuil de détection**

La limite de détection ou seuil de détection consistait à déterminer pour chaque molécule la plus petite quantité d'analyte pouvant être détecté avec précision.

### **h. L'absorbance spécifique ou coefficient d'extinction spécifique :**

Il est calculé suivant la loi de Beer - Lambert formulée par :  $A = \epsilon lc$  avec  $A = D_0 \Leftrightarrow$

$$\epsilon = D_0 / LC$$

$A = D_0 =$  absorbance

$\epsilon =$  coefficient d'extinction spécifique ou absorbance spécifique

L = le trajet parcouru par la lumière

C = concentration de la substance absorbante (ici en g /100 ml)

**NB<sub>3</sub>** : La tolérance d'épaisseur de la cuve utilisée est de  $\pm 0,005$  cm [17].

Veuillez soigneusement à l'entretien et au nettoyage des cuves.

**NB<sub>4</sub>** : Lorsque la monographie donne une seule valeur pour la position d'un maximum d'absorption, il est admis que la valeur obtenue peut s'écarter de  $\pm 2$  nm [17].

**NB<sub>5</sub>** : Quand la concentration est exprimée en g/100 ml l'absorbance est décrite comme l'absorbance spécifique et représentée par le symbole  $A_{1cm}^{1\%}$  ou (1 % ,1 cm) ,défini comme l'absorbance spécifique d'une substance dissoute, sous une épaisseur de 1 cm à une longueur d'onde déterminée [18]. Autrefois connu comme le symbole du coefficient d'extinction spécifique ( $E 1\%, 1$  cm)

#### **IV. APPLICATION – RESULTATS**

**Tableau 7 :** Echantillons d'antirétroviraux utilisés pour la mise au point des monographies de dosage et d'identification :

Produit	DCI	Dosage	N°de lot	Laboratoire	Provenance
<b>INTI</b>					
Videx® 100	Didanosine (ddl)	100 mg	0017	Bristol-Myers Squibb	Hôpital Gabriel Touré
Divir 200	Didanosine (ddl)	200 mg	Y21196	CIPLA	Hôpital Gabriel Touré
ZEFFIX®	Lamivudine (3TC)	5 g/ml	3G003	Glaxo wellcome	Hôpital Gabriel Touré
AVOZAM™	Lamivudine (3TC)	150 mg	1335997	Ranbaxy	Pharmacie Populaire du Mali
ZERIT® 200	Stavudine (D4T)	200 mg	0091	Bristol-Myers Squibb	Hôpital Gabriel Touré
StAVIR 30	Stavudine (D4T)	30 mg	G33479	CIPLA	Hôpital Gabriel Touré
RETROVIR® 250	Zidovudine (AZT)	250 mg	038893	GlaxoSmith kline	Direction de la Pharmacie et du Médicament
AVIROZ™	Zidovudine (AZT)	300 mg	1358149	Ranbaxy	Pharmacie Populaire du Mali
<b>INNTI</b>					
VIRAMUNE®	Névirapine (NVP)	200 mg	304185	Boehringer Inge Lhein	CESAC
NEVIPAN	Névirapine (NVP)	200 mg	1358201	Ranbaxy	Pharmacie Populaire du Mali
STOCRIN®	Efavirenz (EFV)	200 mg	B 1049	Merck Skarp Dohme	Hôpital Gabriel Touré
<b>IP</b>					
CRIXIVAN®	Indinavir (IDV)	400 mg	17330	Merck Skarp Dohme	Hôpital Gabriel Touré
INDIVAN	Indinavir (IDV)	400 mg	217C30162	CIPLA	Hôpital Gabriel Touré
VIRACEPT®	Nelfinavir (NFV)	50mg/g	B1049	Roche	Hôpital Gabriel Touré

**Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

**Tableau 8** : matières premières utilisées pour la validation de l'étude sur les produits finis.

<b>Désignation</b>	<b>Aspect</b>	<b>Laboratoire</b>	<b>Provenance</b>
INTI			
DIDANOSINE	Poudre/flacon	Cipla	DPM
LAMIVUDINE	Poudre/flacon	Cipla	DPM
STAVUDINE	Poudre/flacon	Cipla	DPM
ZIDOVUDINE	Poudre/flacon	Cipla	DPM
INNTI			
NEVIRAPINE	<b>Poudre/flacon</b>	Cipla	DPM
EFAVIRENZ	Poudre/flacon	Cipla	DPM
IP			
INDINAVIR	Poudre/flacon	Cipla	DPM
NELFINAVIR	Poudre/flacon	Cipla	DPM

**Mise au point des méthodes de dosage et d'Identification des ARV**

**Tableau 9** : Prises d'essai et Solutions – Réalisées

Produit	Poids moyen ou volume moyen	Solvant du dosage	Prise d'essai	Concentration finale en principe actif	Provenance
INTR					
Vide x® 100	2081,69 mg	HCl 0,1N	208,169 mg	0,01 mg/ ml	H GT
DIVIR 200	2005,20 mg	HCl 0,1 N	100,295 mg	0,01 mg/ ml	H GT
DiDANOSINE/REFERENCE	NA	HCl 0,1 N	10 mg	0,01 mg/ ml	DPM
ZEFFIX®	240 ml	HCl 0,1N	2 ml	0,01 mg/ ml	H GT
AVOLAM™	388,50 mg	HCl 0,1N	12,95 mg	0,01 mg/ ml	DPM
LAMIVUDINE/REFERENCE	NA	HCl 0,1N	10 mg	0,01 mg/ ml	DPM
ZERIT® 200	12825 mg	HCl 0,1N	641,25 mg	0,01 mg/ ml	HGT
STAVIR 30	209,62 mg	HCl 0,1N	69,873 mg	0,01 mg/ ml	HGT
STAVUDINE/REFERENCE	NA	HCl 0,1N	10 mg	0,01 mg/ ml	DPM
RETROVIR®	414,53 mg	Eau distillée	16,5 mg	0,01 mg/ ml	DPM
AVIROZ™	389,74 mg	Eau distillée	12,99 mg	0,01 mg/ ml	DPM
ZIDOVUDINE/REFERENCE	NA	Eau distillée	10 mg	0,01 mg/ ml	DPM
INNTI					
VIRAMUNE®	806,35 mg	Méthanol	40,4715 mg	0,01 mg/ ml	CESAC
NEVIPAN	802,43 mg	Méthanol	40,1215 mg	0,01 mg/ ml	PPM
NEVIRAPINE/REFERENCE	NA	Méthanol	10 mg	0,01 mg/ ml	DPM
STOCRIN®	515,74 mg	NaOH 0,1 N Méthanol/Eau	25,787 mg	0,01 mg/ ml	HGT
EFAVIRENZ/REFERENCE	NA	NaOH 0,1 N Méthanol/Eau	10 mg	0,01 mg/ ml	DPM
IP					
CRIXIVAN®	667,78 mg	HCl 0,1N	16,697 mg	0,01 mg/ ml	HGT
INDIVAN	581,79 mg	HCl 0,1N	14,54475 mg	0,01 mg/ ml	HGT
INDINAVIR/REFERENCE	NA	HCl 0,1N	10 mg	0,01 mg/ ml	DPM
VIRACEPT®		HCl 0,1N Méthanol/Eau	200 mg	0,01 mg/ ml	HGT
NELFINAVIR/REFERENCE	NA	HCl 0,1N Méthanol/Eau	10 mg	0,01 mg/ ml	DPM

**NB<sub>6</sub>** la concentration finale est obtenue suivant la prise d'essai correspondant à 10 mg de principe actif, calculée et dissoute dans une fiole de 100 ml avec le solvant approprié, il est ensuite effectué un prélèvement de 1 ml de la solution précédente puis diluer dans une fiole de 10 ml.

NA = non appliqué

## **4.1 Validation du système**

### **4.1.1 Matériel**

Le dosage spectrophotométrique est effectué à l'aide du spectrophotomètre UV/V couplé à un imprimant.

### **4.1.2 Validation de l'absorbance**

Le but est de vérifier la répétabilité suivant l'étude des paramètres de variabilité des absorbances au cours du dosage spectrophotométrique à une concentration bien définie (ici 1 mg/ 100 ml).

**NB<sub>7</sub>** :L'essai est réalisé avec les matières premières.

#### **a. Didanosine**

- Conditions opératoires
- Solvant et blanc : acide chlorhydrique 0,1 N ;
- Longueur d'onde de l'absorbance  $\lambda = 248$  nm ;
- Zone de lecture du spectre entre : 200-300 nm.

#### **✓ Résultats**

<b>Nombre de lecture</b>	<b>Densité optique</b>
1	0,45924
2	0,46552
3	0,46342
4	0,46842
5	0,45739
6	0,45814

- Moyenne = 0,46202 ;
- Ecart type = 0,0034 ;
- Coefficient de variation cv% = 0,73%.

#### **b. Lamivudine**

- Conditions opératoires
- Solutions de dissolution et blanc : acide chlorhydrique 0, 1 N ;
- Longueur d'onde de l'absorbance  $\lambda = 280$  nm ;
- Zone de lecture du spectre entre : 220-350 nm.

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

### ✓ Résultats

Nombre de lecture	Densité optique
1	0,61712
2	0,60192
3	0,59876
4	0,60623
5	0,60766
6	0,61382

- Moyenne = 0,607585 ;
- Ecart type = 0,0063 ;
- Coefficient de variation cv% = 1,03%.

### c. Stavudine

- Conditions opératoires
- Solvant: acide chlorhydrique 0, 1 N ;
- Longueur d'onde de l'absorbance  $\lambda = 265$  nm ;
- Zone de lecture du spectre entre : 200-350 nm.

### ✓ Résultats

Nombre de lecture	Densité optique
1	0,45308
2	0,45651
3	0,46378
4	0,44343
5	0,45295
6	0,44638

- Moyenne = 0,4526883 ;
- Ecart type = 0,0055 ;
- Coefficient de variation cv% = 1,21%.

### d. Indinavir

- Conditions opératoires
- Solvant et blanc : Acide chlorhydrique 0, 1 N
- Longueur d'onde de l'absorbance  $\lambda = 260$  nm ;
- Zone de lecture du spectre entre : 220-350 nm.

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

### ✓ Résultats

Nombre de lecture	Densité optique
1	0,107505
2	0,107765
3	0,104286
4	0,109816
5	0,108663
6	0,106055

- Moyenne = 0,10734833 ;
- Ecart type = 0,0018 ;
- Coefficient de variation cv% = 1,67%.

### e. Zidovudine

- Conditions opératoires
- Solvant et blanc : Eau distillée ;
- Longueur d'onde de l'absorbance  $\lambda = 267$  nm ;
- Zone de lecture du spectre entre : 220-350 nm.

### ✓ Résultats

Nombre de lecture	Densité optique
1	0,38114
2	0,37994
3	0,38375
4	0,38036
5	0,38390
6	0,38467

- Moyenne = 0,3822946 ;
- Ecart type = 0,0031 ;
- Coefficient de variation cv% = 0,81%.

### f. Névirapine

- Conditions opératoires
- Solvant et blanc : Méthanol ;
- Longueur d'onde de l'absorbance  $\lambda = 285$  nm ;
- Zone de lecture du spectre entre : 220-350 nm.

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

### ✓ Résultats

Nombre de lecture	Densité optique
1	0,28953
2	0,28143
3	0,28733
4	0,28670
5	0,28645
6	0,28251

- Moyenne = 0,2856583 ;
- Ecart type = 0,0028 ;
- Coefficient de variation cv% = 0,98%.

### g. Nelfinavir

- Conditions opératoires
- Solvant : Acide chlorhydrique 0, 1 N ;
- Longueur d'onde de l'absorbance  $\lambda = 250$  nm ;
- Zone de lecture du spectre entre : 220-350 nm.

### ✓ Résultats

Nombre de lecture	Densité optique
1	0,10829
2	0,11454
3	0,11265
4	0,11245
5	0,11240
6	0,10966

- Moyenne = 0,111665 ;
- Ecart type = 0,0021 ;
- Coefficient de variation cv% = 1,88% .

### h. Efavirenz

- Conditions opératoires
- Solvant et blanc : hydroxyde de sodium 0, 1 N ;
- Longueur d'onde de l'absorbance  $\lambda = 267$  nm ;
- Zone de lecture du spectre entre : 220-350 nm

✓ **Résultats**

Nombre de lecture	Densité optique
1	0,56168
2	0,56748
3	0,56630
4	0,56019
5	0,56726
6	0,57475

- Moyenne = 0,5662766 ;
- Ecart type = 0,0047 ;
- Coefficient de variation cv% = 0,83%.

**Remarque 1 :** Pour l'ensemble des composés, la précision expliquée par le coefficient de variation est inférieure à 2% et les écarts types définis sont également inférieure à  $70 \cdot 10^{-4}$

#### **4.1.3 Validation de la linéarité**

Le but est de vérifier la linéarité des mesures de concentrations suivant une zone de densité optique ( $D_o$ ) définie par notre étude (ici 0,200 – 0,500).

**Mise au point des méthodes de dosage et d'Identification des ARV**

**Tableau 10** : tableau de la linéarité

Formulation	Concentration en mg/ml	Absorbance	Type de calibration
<b>INTI</b>			
DIDANOSINE	0,005	0,23326	Linéarité passant par zéro
	0,006	0,27205	
	0,007	0,32499	
	0,008	0,37381	
	0,01	0,46592	
LAMIVUDINE	0,003	0,21380	Linéarité passant par zéro
	0,004	0,23625	
	0,005	0,30973	
	0,006	0,66180	
	0,007	0,48843	
STAVUDINE	0,006	0,21243	Linéarité passant par zéro
	0,007	0,28570	
	0,008	0,32534	
	0,012	0,48843	
ZIDOVUDINE	0,006	0,23365	Linéarité passant par zéro
	0,008	0,31029	
	0,012	0,37994	
	0,012	0,44744	
	0,013	0,49888	
<b>INNTI</b>			
NEVIRAPINE	0,008	0,21928	Linéarité passant par zéro
	0,010	0,28565	
	0,013	0,36952	
	0,015	0,41554	
EFAVIRENZ	0,004	0,23561	Linéarité passant par zéro
	0,005	0,28313	
	0,006	0,33970	
	0,007	0,40506	
	0,008	0,45919	
<b>IP</b>			
INDINAVIR	0,020	0,20940	Linéarité passant par zéro
	0,025	0,26500	
	0,030	0,32523	
	0,035	0,43382	
	0,040	0,47725	
NELFINAVIR	0,020	0,20369	Linéarité passant par zéro
	0,025	0,24912	
	0,030	0,30372	
	0,035	0,34684	
	0,040	0,40909	

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

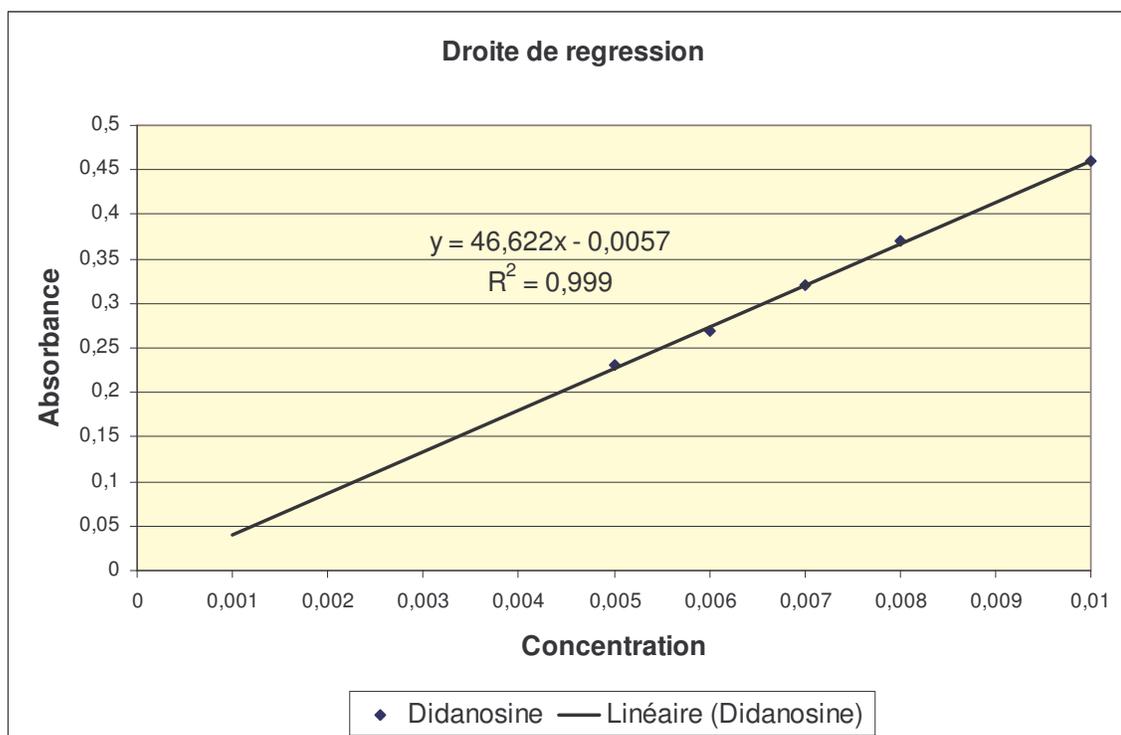
**Remarque 2 :** Les solutions ont été faites après la dissolution de la prise d'essai (10mg) dans une fiole de 100ml et ensuite les concentrations sont variées à la dilution dans les fioles de 10ml ce qui correspond à la concentration finale.

La linéarité des méthodes a été étudiée avec de faibles concentrations après calcul de la droite de régression linéaire suivant les équations de la forme :  $y = a x + b$ .

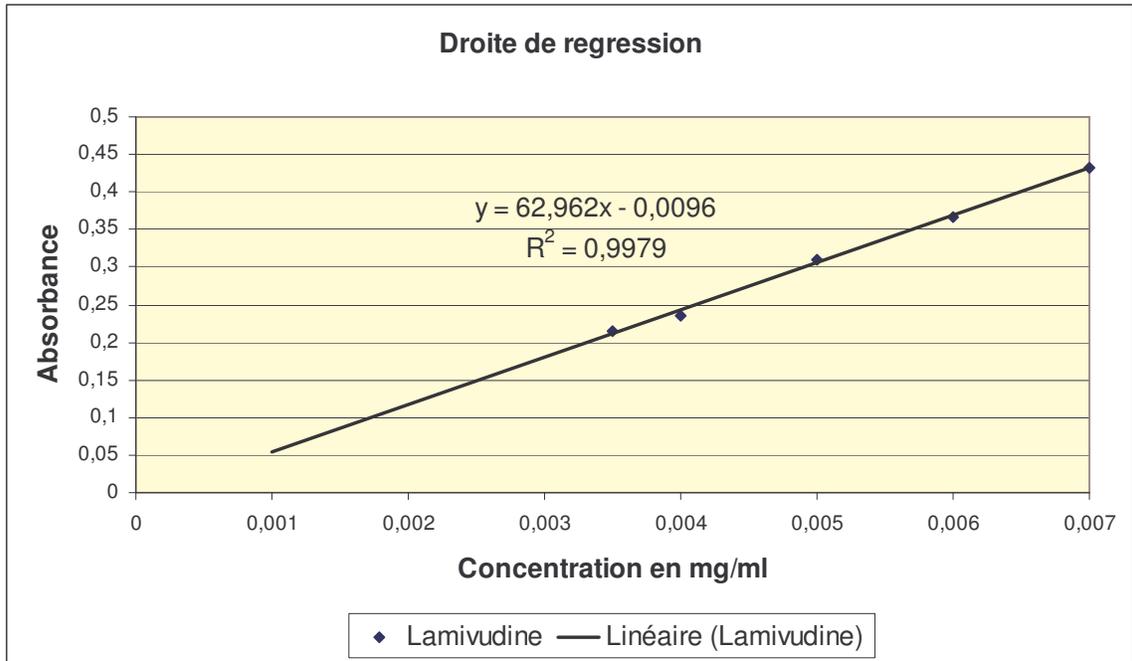
Pour l'ensemble des composés les coefficients de corrélations étaient supérieurs à 0,99.

### 4.1.3.1 Droite de régression

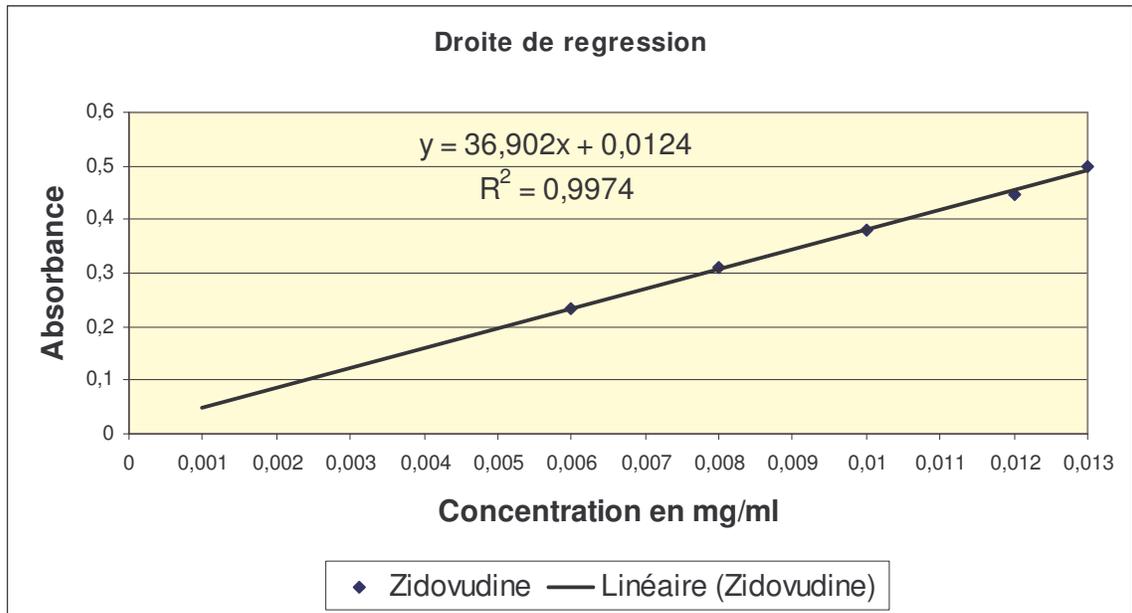
#### a. Didanosine



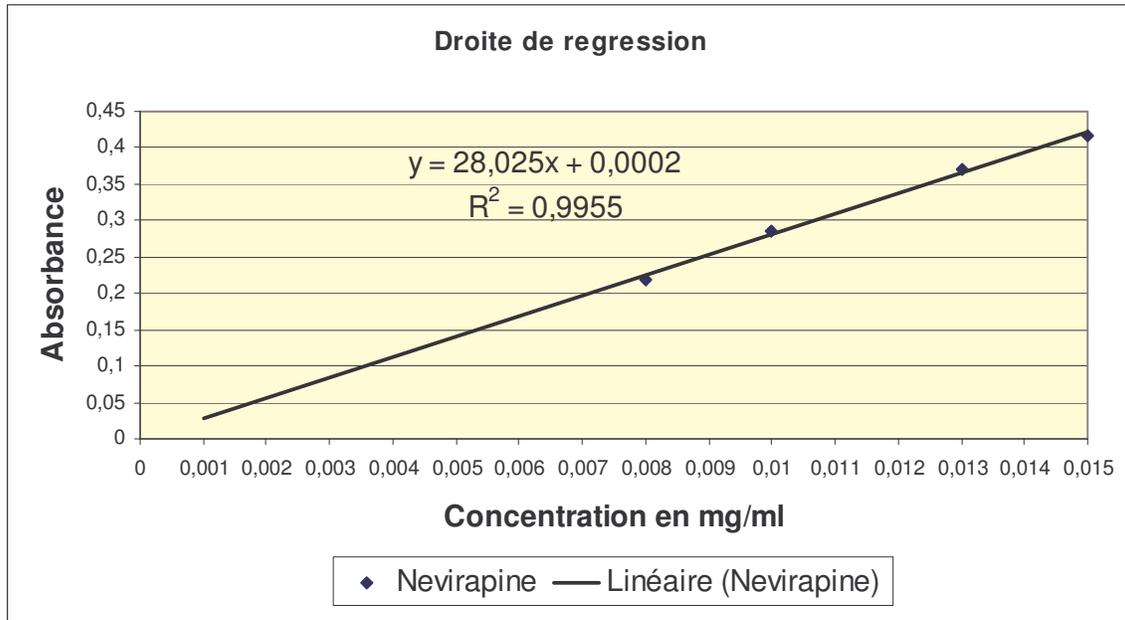
b. Lamivudine



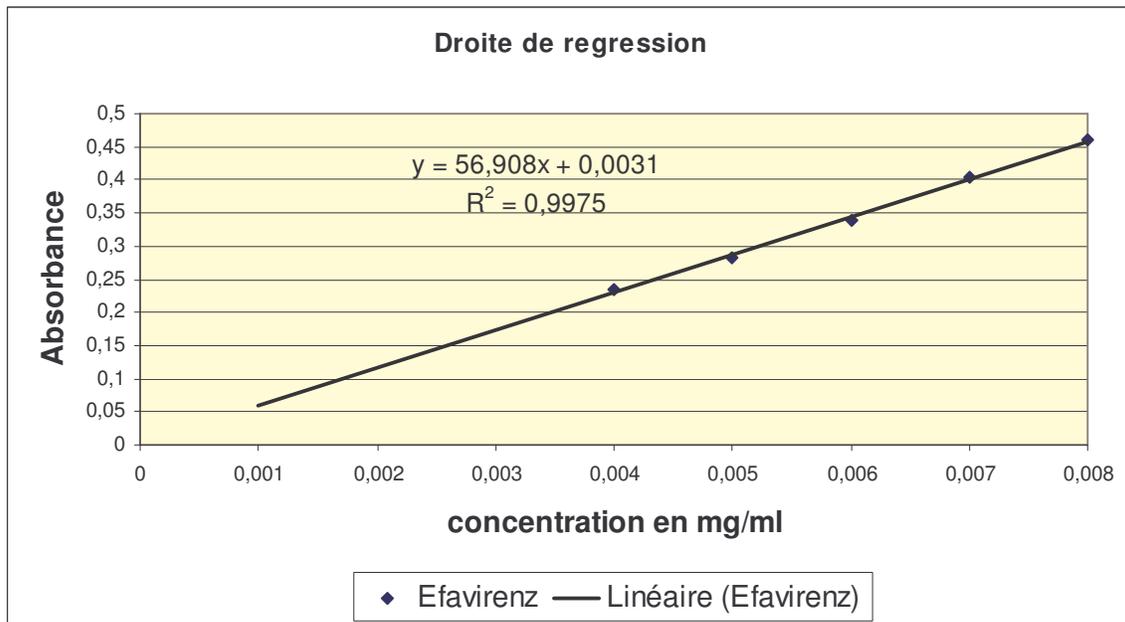
c. Zidovudine



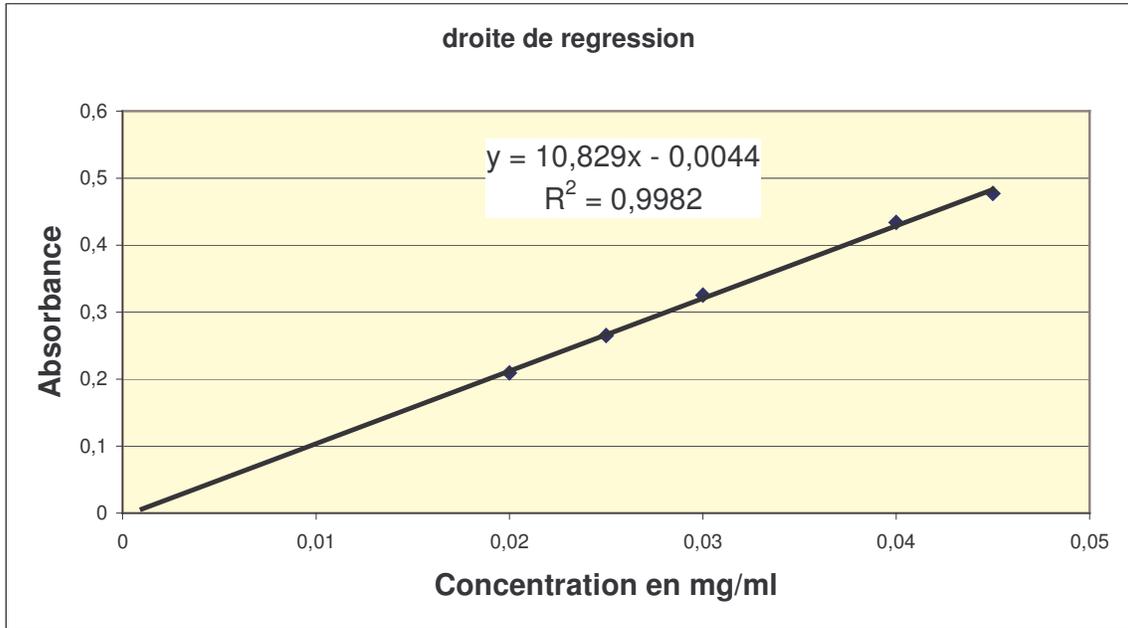
d. Nevirapine



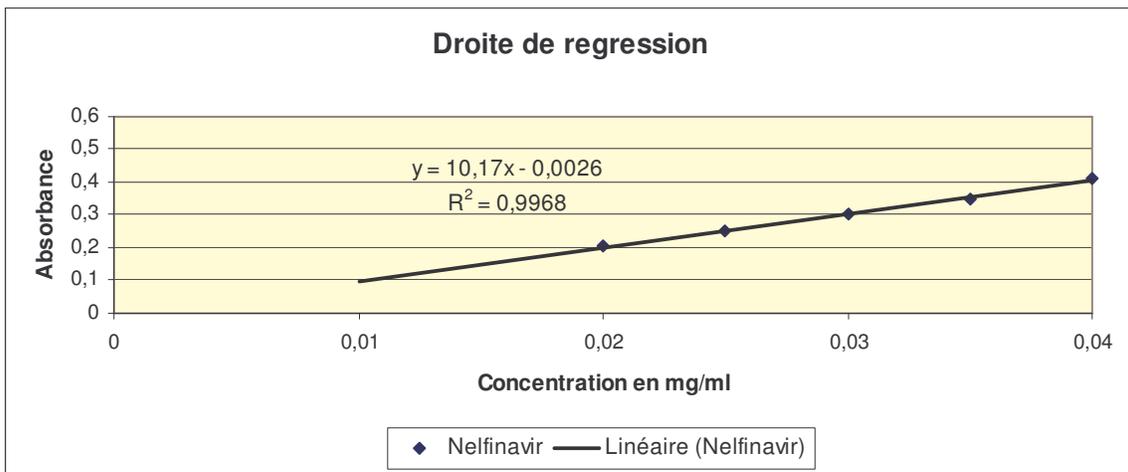
e. Efavirenz



f. Indinavir



g. Nelfinavir



## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

### **4.1.4 Validation de la reproductibilité**

Le but est de vérifier la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée à des dates différentes.

**Tableau 11** : Tableau sur la reproductibilité des procédures d'analyses au cours de nos différents essais.

DESIGNATION	Nombre d'essai	Coefficient de Variation (CV) en %
Didanosine	08	0,32
Lamivudine	08	0,29
Stavudine	08	0,69
Zidovudine	08	1,52
Nevirapine	08	0,74
Indinavir	08	0,49
Nelfinavir	08	3,67

**Remarque3** : la précision exprimée par le coefficient de variation est inférieure à 4% pour l'ensemble des composés.

Contrairement à l'étude réalisée sur la reproductibilité par K.Titier, F. Lagrange, F. Péhourcq, L. Edno-Mcheik et M. Molimard qui apporte un coefficient de variation inférieure à 11%

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

### 4.1.5 Validation de la stabilité des solutions du dosage.

Le but est de vérifier la stabilité des solutions dans le temps.

**Tableau 12** : la stabilité des molécules suivant 72 heures de stockage.

Désignation	Temps/heures	Densité optique	Concentration mg/100 ml	Solvant
<b>INNTI</b>				
DIDANOSINE	24	0,456726	1	HCl 0,1N
	48	0,459283		
	72	0,460307		
LAMIVUDINE	24	0,609750	1	HCl 0,1N
	48	0,610420		
	72	0,459460		
STAVUDINE	24	0,453160	1	HCl 0,1N
	48	0,460420		
	72	0,459460		
ZIDOVUDINE	24	0,233650	0,6	Eau distillée
	48	0,241920		
	72	0,234940		
<b>INNTI</b>				
NEVIRAPINE	24	0,282604	1	Méthanol
	48	0,284520		
	72	0,287745		
EFAVIRENZ	24	0,566393	1	NaOH 0,1N
	48	0,368760		
	72	-----		
<b>IP</b>				
INDINAVIR	24	0,261500	2,5	HCl 0,1N
	48	0,267151		
	72	0,257453		
NELFINAVIR	24	0,110203	1	HCl 0,1N
	48	0,112566		
	72	0,119987		

**Remarque 4** : la stabilité des molécules a été étudiée à partir de différents contrôles (0,6 mg/100 ml pour le zidovudine, 2,5 mg/100 ml pour l'indinavir et 1 mg/100 ml pour le reste des molécules) stockés à la température ambiante.

Toutes les molécules sont stables 72 heures à la température ambiante, sauf l'efavirenz qui apparaît instable à partir du premier jour de l'analyse

### 4.1.6 Qualification de la limite de détection

Le but est de déterminer la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée avec précision

**Tableau 13** : l'étude de la limite de détection sur les molécules ARV.

Formulation	Limite de détection	Milieu de dissolution
INTI		
DIDANOSINE	0,5 µg/ml	HCl 0,1N
LAMIVUDINE	2 ng/ml	HCl 0,1N
STAVUDINE	20 ng/ml	HCl 0,1N
ZIDOVUDINE	0,6 ng/ml	Eau distillée
INNTI		
NEVIRAPINE	0,4 ng/ml	Méthanol
EFAVIRENZ	20 ng/ml	Méthanol/Eau (75/25)
	1 ng/ml	NaOH 0,1N
IP		
INDINAVIR	15 µg/ml	HCl 0,1N
NELFINAVIR	2,5 ng/ml	Méthanol/Eau (75/25)
	1 µg/ml	HCl 0,1N

**Remarque 5** : la limite de détection est réalisée à différents concentrations de principe actif dans les différents solvants indiqués au tableau 13. Elle est de l'ordre du microgramme pour la didanosine, indinavir et nelfinavir et de l'ordre du nano gramme pour la lamivudine, zidovudine, nevirapine, efavirenz, stavudine, nelfinavir.

**4.1.7** Dosage des principes actifs par spectrophotomètre ultra- violet/visible  
Détermination de l'absorbance spécifique ou coefficient d'extinction spécifique.

✓ **Rappel :**

Suivant la loi de BEER - LAMBERT définissant le coefficient d'extinction spécifique par :  $A = D_0 = \epsilon lc \iff \epsilon = D_0 / Lc$

OÙ

$\epsilon$  = Coefficient d'extinction spécifique ;

A = Absorbance ;

L = Longueur du trajet optique;

c = Concentration de la solution à examiner (ici g/100 ml).

**Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

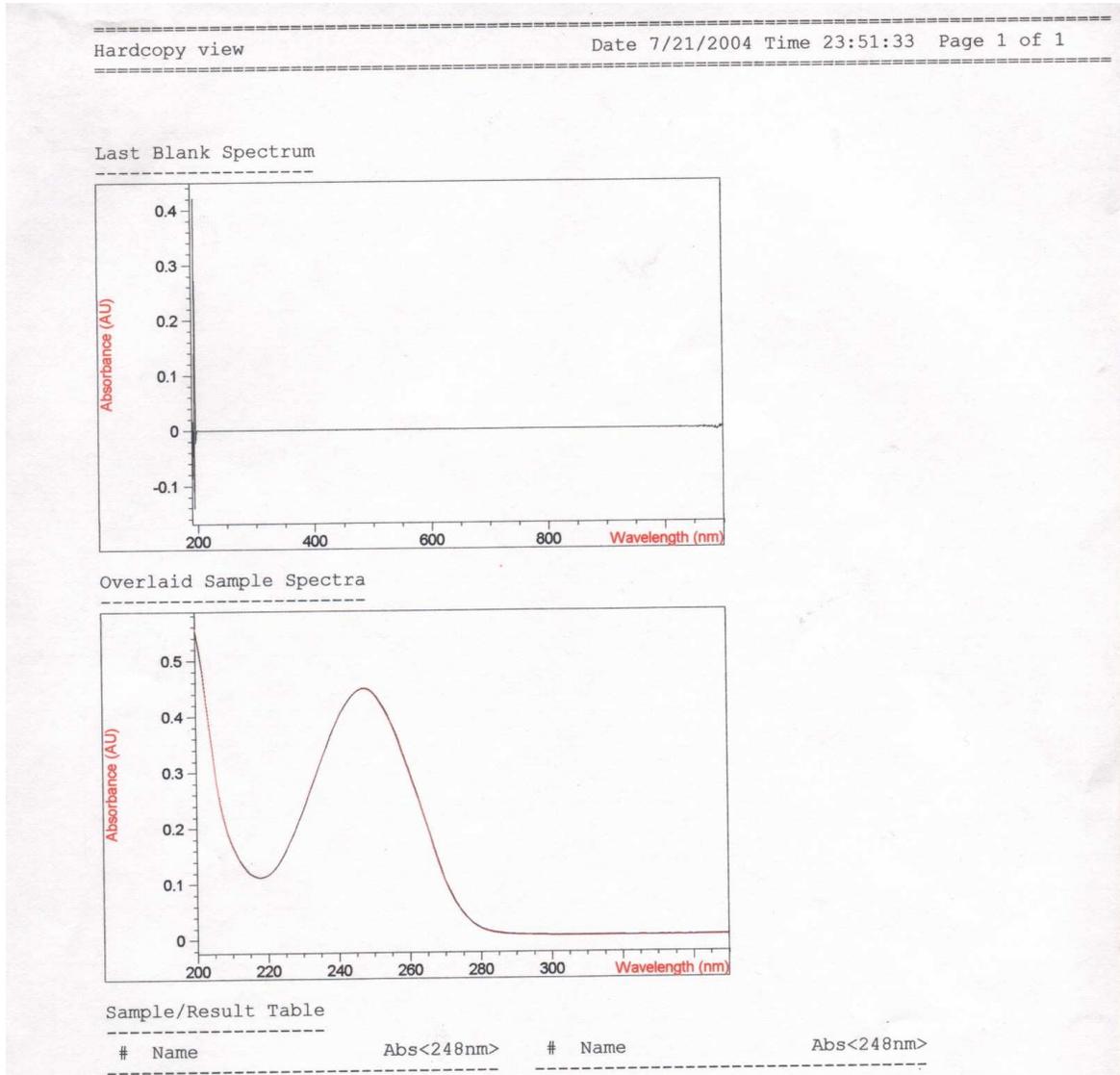
**Tableau 14:** Absorbance spécifique des huit ARV de l'étude.

Désignation du Produit	Longueur d'onde de mesure ou $\lambda$ (nm)	Absorbance spécifique $A_{1\text{cm}} \%$	Milieu de dissolution
DIDANOSINE	248	462	HCl 0,1N
LAMIVUDINE	280	607	HCl 0,1N
STAVUDINE	265	453	HCl 0,1N
ZIDOVUDINE	267	382	Eau distillée
NEVIRAPINE	285	286	Méthanol
EFAVIRENZ	267	566	NaOH 0,1N
	247	521	Méthanol/Eau
INDINAVIR	260	107	HCl 0,1N
NELFINAVIR	254	178	Méthanol/Eau
	250	112	HCl 0,1N

**Remarque 6 :** les longueurs d'onde des absorbances sont inférieures à 300nm et supérieures à 235 nm avec des absorbances spécifiques comprises entre 100 et 650.

**4.2 Spectres d'absorption dans l'UV des 8, molécules de l'étude**

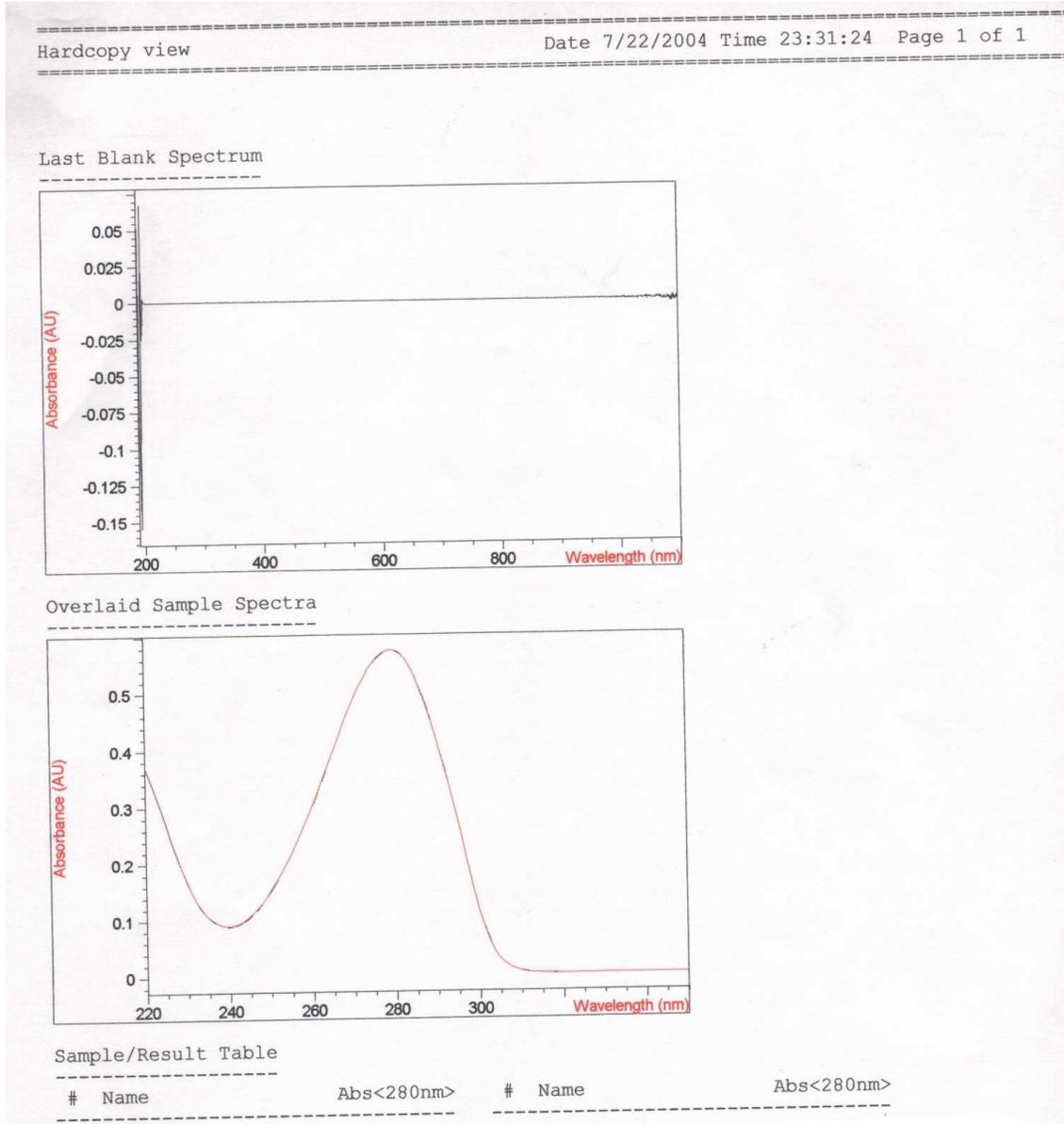
**a. Didanosine dans HCl 0,1N**



**Remarque 7** : le spectre d'absorption utilisé pour identifier la bande d'absorption de didanosine a été réalisé à partir de deux solutions (dissolution et la dilution) de didanosine dans HCl 0,1N.

Pour une concentration correspondant à 10 mg de didanosine la bande est visible et le maximum d'absorption est à 248 nm.

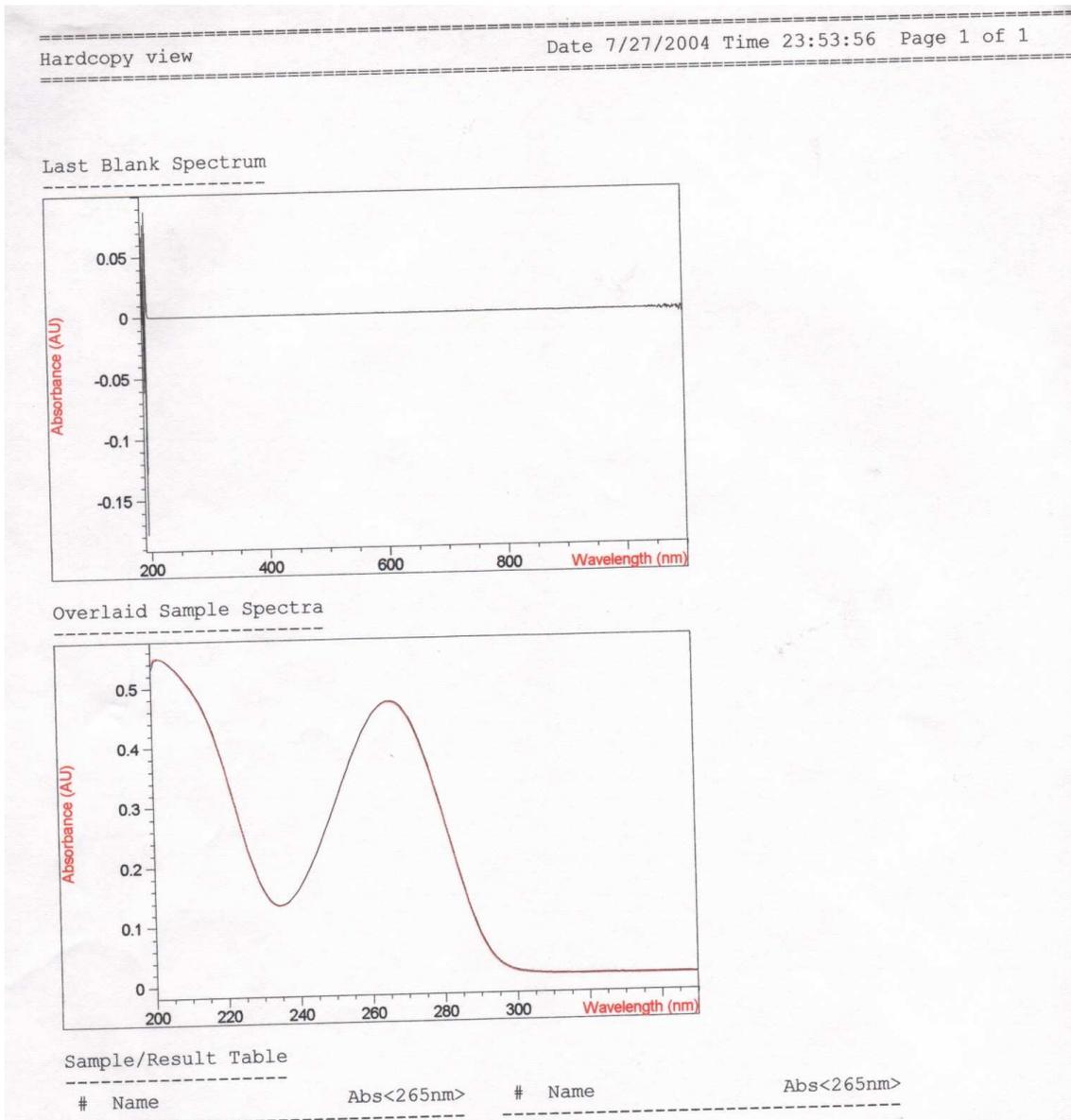
**b. Lamivudine dans HCl 0,1N**



**Remarque 8** : le spectre d'absorption utilisé pour identifier la bande d'absorption de Lamivudine a été réalisé à partir de deux solutions (dissolution et dilution) de Lamivudine dans HCl 0,1N.

Pour une prise d'essai correspondant à 10 mg de Lamivudine, la bande est visible et le maximum d'absorption est à 280 nm

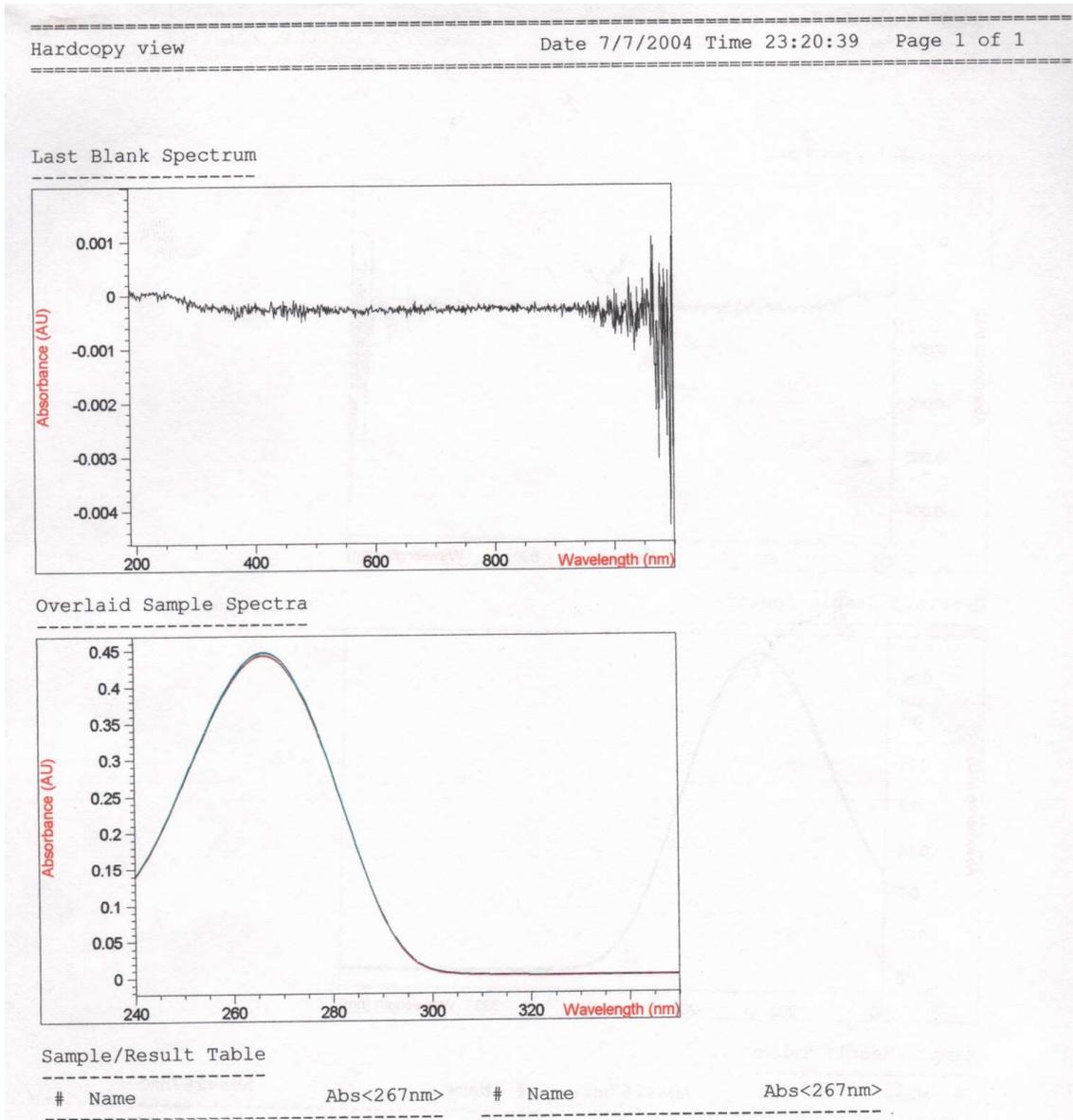
**c. Stavudine dans HCl 0,1N**



**Remarque 9** : le spectre d'absorption utilisé pour identifier la bande d'absorption de la Stavudine a été réalisé à partir de deux solutions (dissolution et dilution) de didanosine dans HCl 0,1N.

Pour une prise d'essai correspondant à 10 mg de Stavudine, la bande est visible et le maximum d'absorption est à 265 nm.

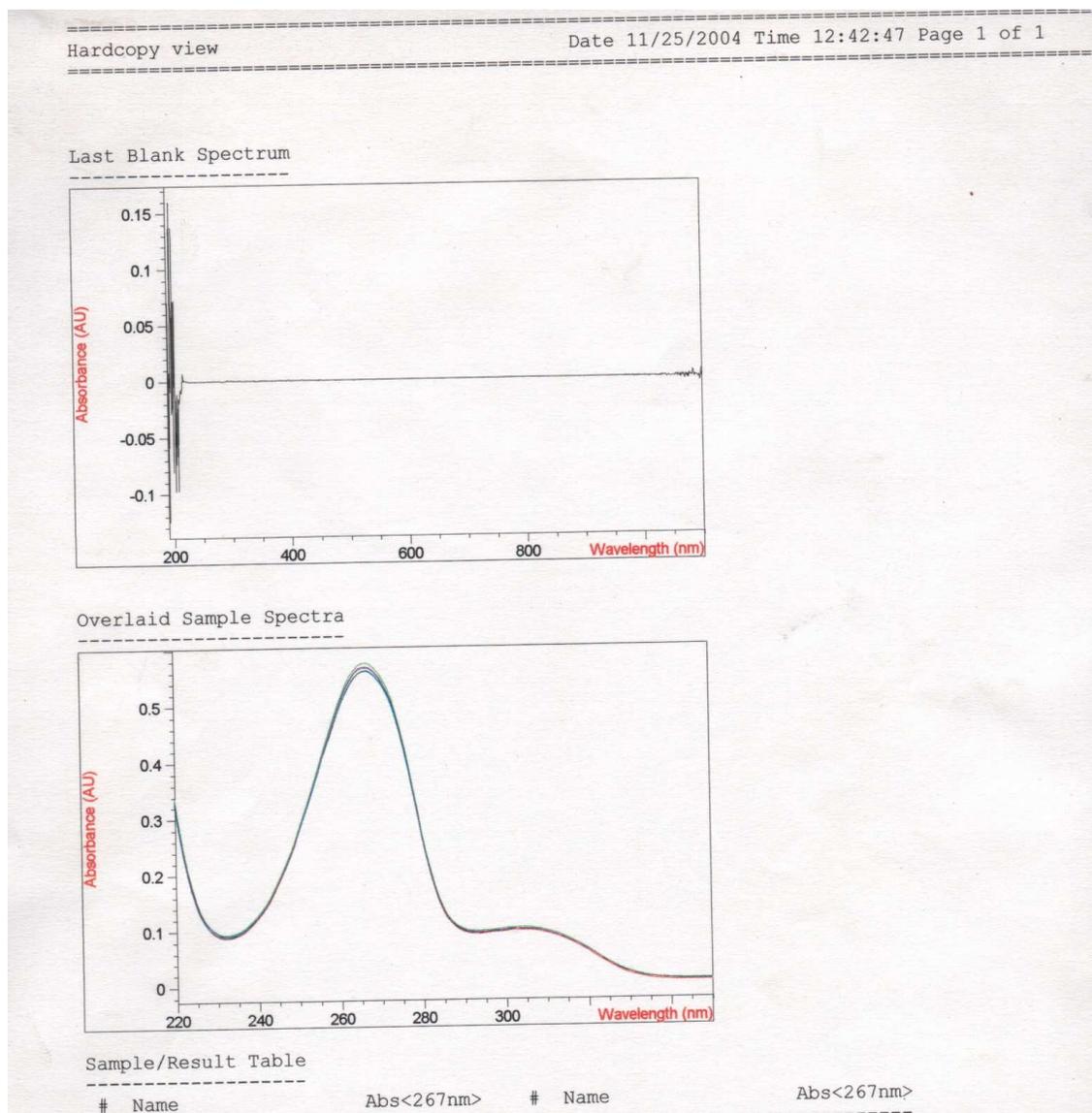
**d. Zidovudine dans le milieu aqueux**



**Remarque 10 :** La Zidovudine en milieu aqueux révèle une seule bande d'absorption maximale à 267 nm.

Le spectre d'absorption utilisé pour l'identification à été réalisé à partir de deux solutions (dissolution et dilution) de Zidovudine dans le milieu aqueux avec une prise d'essai correspondant à 10 mg de P.a.

**e. Efavirenz dans NaOH 0,1N**

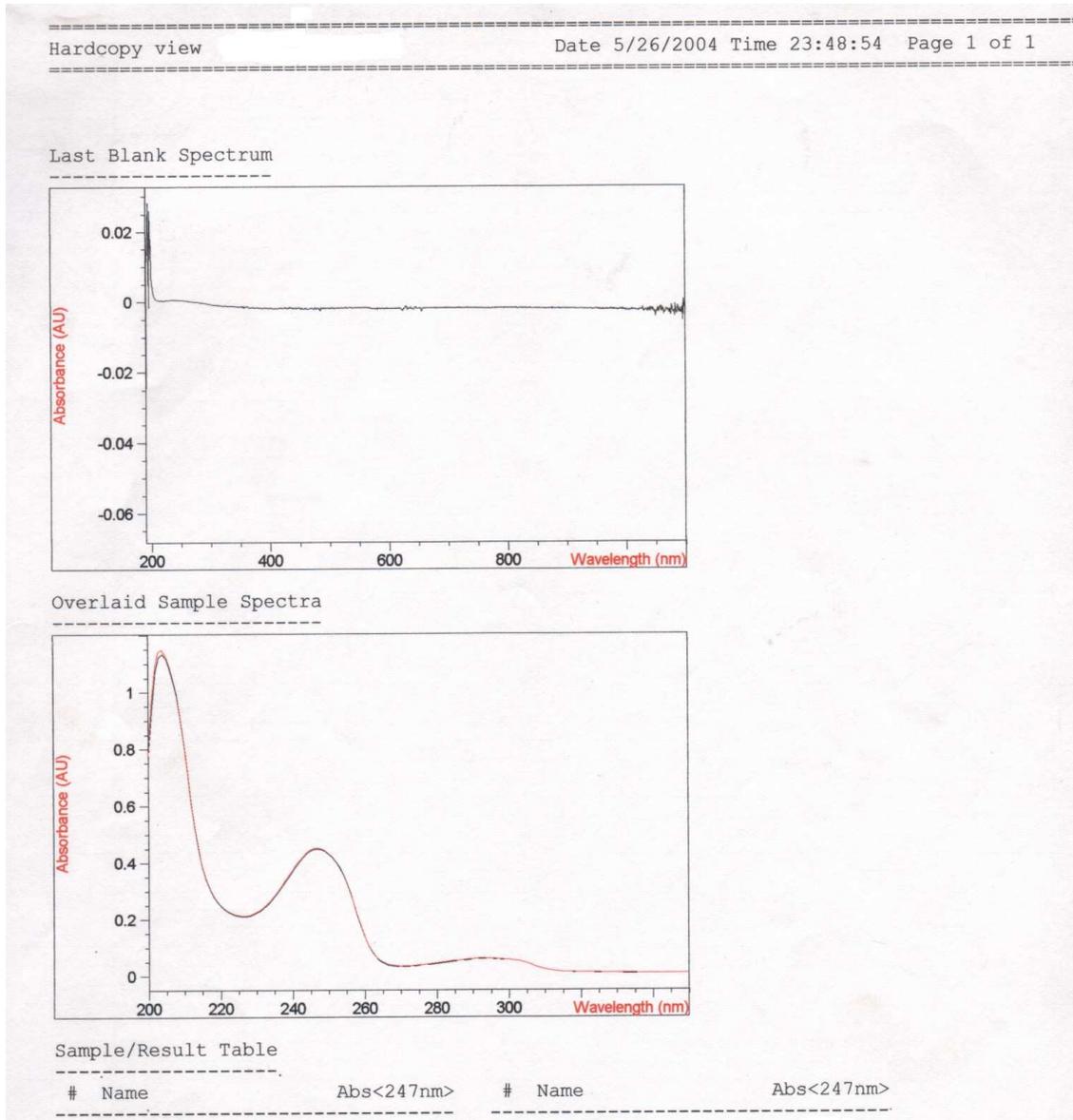


**Remarque 11** : le spectre d'absorption utilisé pour identifier les bandes d'absorption de l'efavirenz a été réalisé à partir de deux solutions (dissolution et dilution) de l'efavirenz dans NaOH 0,1N.

Pour une prise d'essai correspondant à 10 mg de l'efavirenz en solution, les bandes sont situées à 267 nm et à 313nm.

La bande à 267nm est plus importante.

**f. Efavirenz dans méthanol/eau (75/25)**

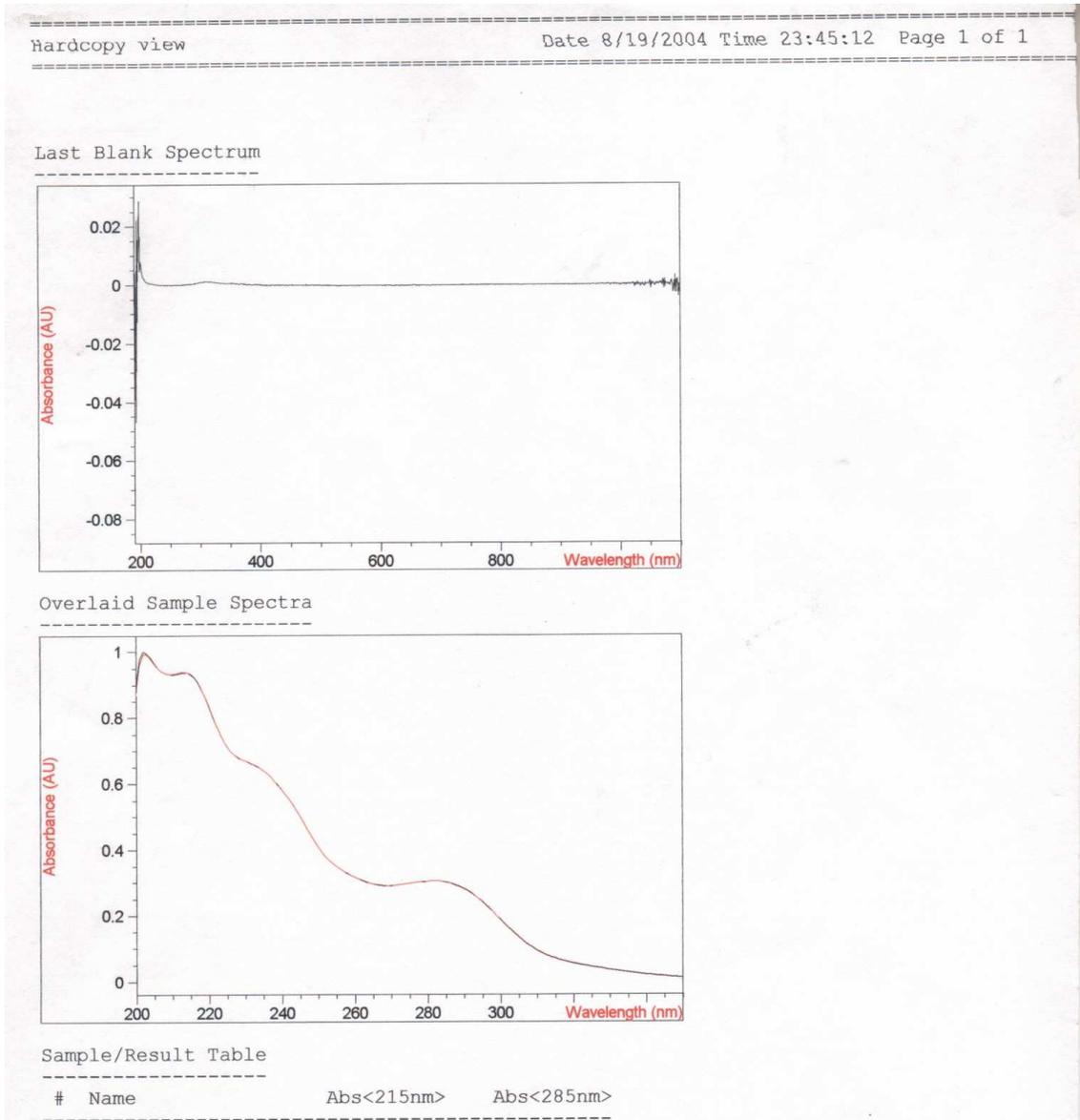


**Remarque 12** : le spectre d'absorption utilisé pour identifier les bandes d'absorption de l'efavirenz a été réalisé à partir de deux solutions (dissolution et dilution) de l'efavirenz dans le mélange de solvant méthanol/ eau (75/25).

Pour une prise d'essai correspondant à 10 mg de l'efavirenz en solution, les bandes sont visibles à 247 nm et à 290nm.

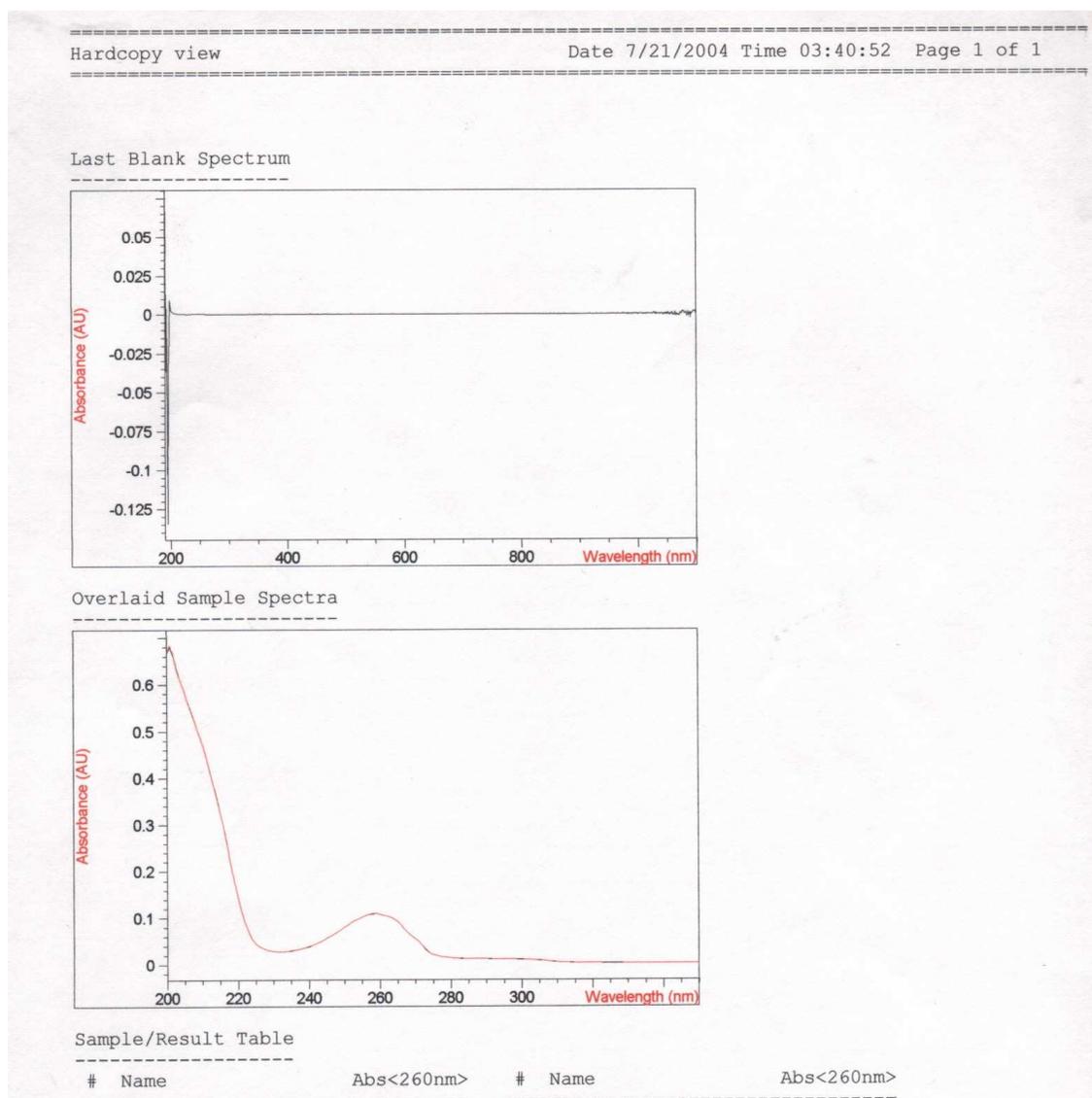
La bande à 247nm est la plus importante.

**g. Nevirapine dans méthanol**



**Remarque 13 :** le spectre d'absorption utilisé pour identifier les bandes d'absorption de la Nevirapine a été réalisé à partir de deux solutions (dissolution et dilution) de la Nevirapine dans le méthanol. Pour une prise d'essai correspondant à 10 mg de la Nevirapine en solution, les bandes sont visibles à 215 nm ,232 nm et à 285 nm. La bande à 285 nm présente une DO plus importante que les deux autres bandes.

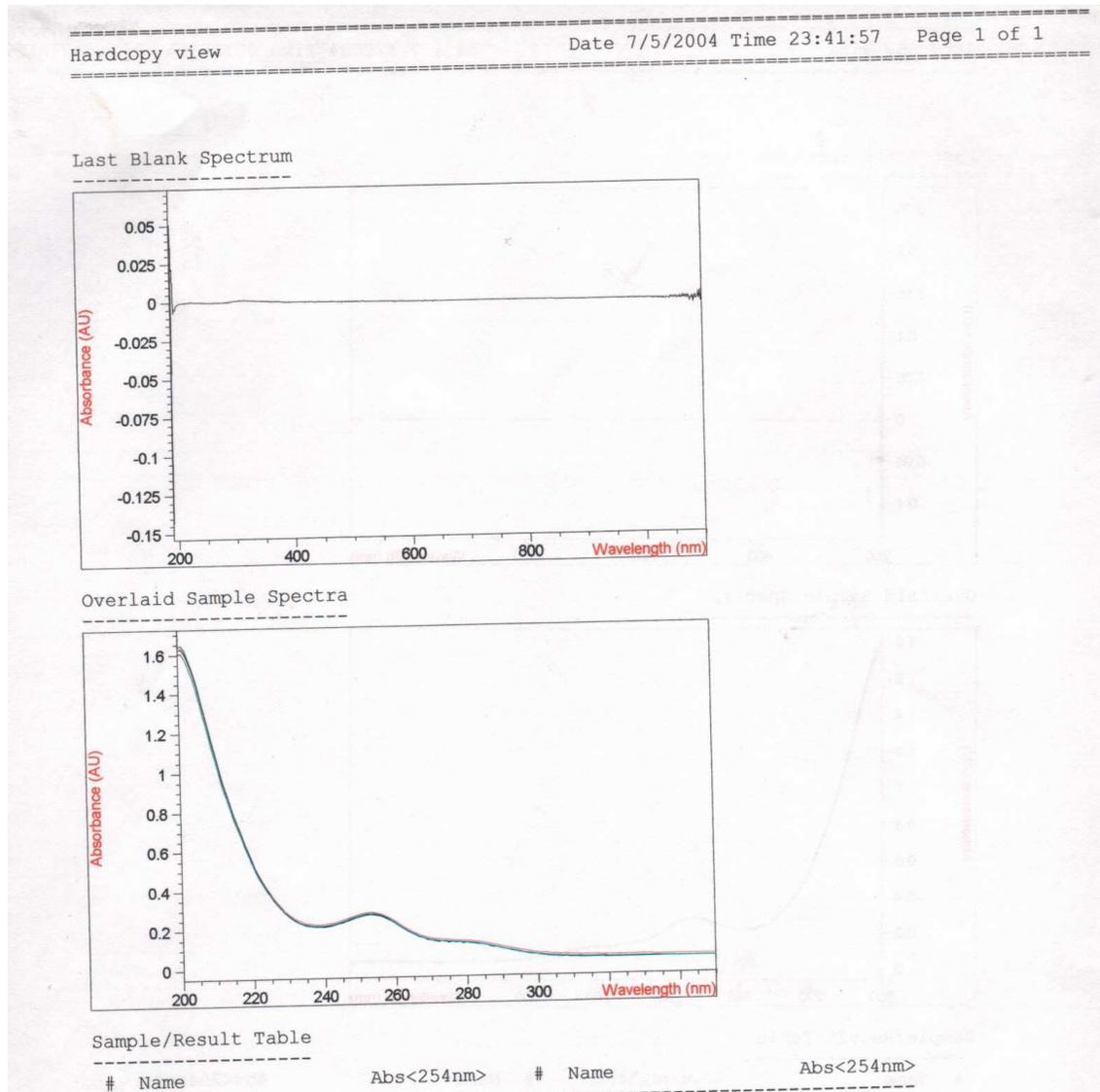
**h. Indinavir dans HCl 0,1N**



**Remarque 14** : L'Indinavir dans milieu HCl 0,1 N révèle une seule bande d'absorption maximale à 260 nm.

Le spectre d'absorption utilisé pour l'identification à été réalisé à partir de deux solutions (dissolution et dilution) d' Indinavir dans le solvant HCl 0,1N avec une prise d'essai correspondant à 10 mg de P.a.

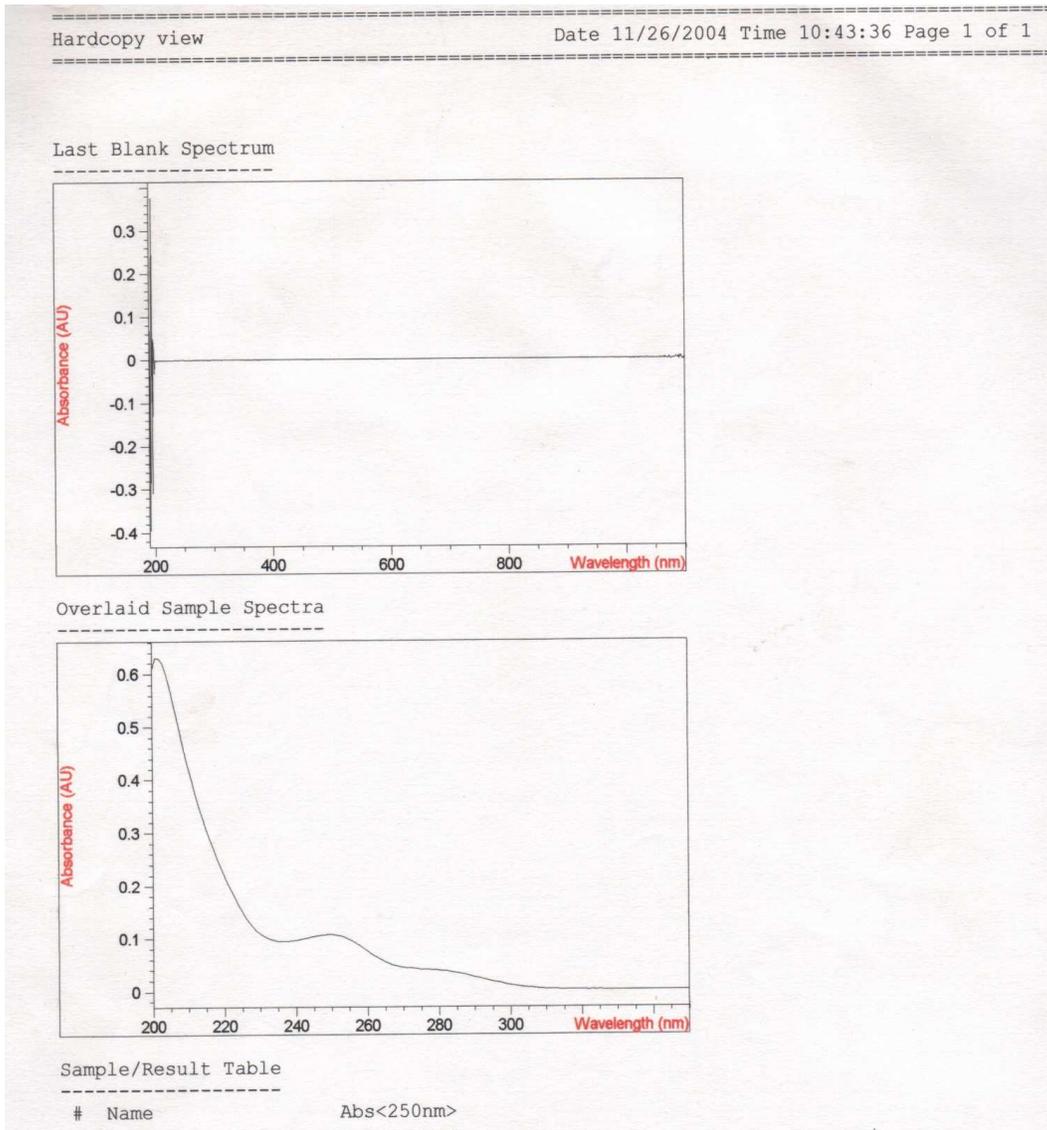
**i. Nelfinavir dans méthanol/eau (75/25)**



**Remarque 15** : le spectre d'absorption utilisé pour identifier la bande d'absorption du Nelfinavir a été réalisé à partir de deux solutions de Nelfinavir dans le mélange de solvant méthanol/ eau (75/25).

Pour une prise d'essai correspondant à 10 mg de Nelfinavir, la bande est visible et le maximum d'absorption est à 254 nm.

**j. Nelfinavir dans HCl 0,1N**



**Remarque 16** : le spectre d'absorption utilisé pour identifier la bande d'absorption du Nelfinavir a été réalisé à partir de deux solutions de Nelfinavir dans le solvant HCl0,1N

Pour une prise d'essai correspondant à 10 mg de Nelfinavir, la bande du maximum d'absorption est à 250 nm.

### 4.3 Méthodes d'identification des molécules ARV

#### a. Identification des principes actifs par la chromatographie sur couche mince (CCM) :

- Conditions opératoires
- Les principes actifs sont en solution méthanolique.
- Solvant de développement ou phase mobile : mélange de solvant (Méthanol 10V + Chlorure de méthylène 90V)
- Plaque gel de silice F254

On développe sur un parcours de 9 cm. Puis on laisse sécher la plaque à l'air et ensuite on l'examine en lumière ultra- violet à  $\lambda = 254$  nm.

#### ✓ Résultats

Désignation du produit	Rapport frontal (Rf)
INTI	
DDI	0,17
3TC	0,13
D4T	0,36
AZT	0,55
INNTI	
NVP	0,76
EFV	0,72
IP	
IDV	0,45
NFV	0,42

**Remarque 16** : les différents Rf obtenus permettent d'identifier chaque molécule de l'étude et correspondent chacun au rapport de la distance parcourue par la substance sur la distance parcourue par la phase mobile, la mesure s'effectuant à partir du point de dépôt.

**b. Identification des principes actifs par le test de coloration**

**Tableau 14** : Identification des molécules suivant les tests de coloration.

Désignation du produit	Réactifs de l'identification	Observation
DDI	Neesler Liebermann Acide sulfurique -formaldéhyde	Jaune Jaune Rouge
3TC	Liebermann	Jaune
D4T	Neesler Acide sulfurique Mandelein	Jaune Précipité noir Noire
AZT	Mandelein	Jaune
NVP	Liebermann	Jaune
EFV	Acide sulfurique Mandelein	Jaune-brun Jaune
IDV	Liebermann Acide sulfurique	Précipité orange Jaune
NFV	Acide sulfurique /formaldehyde Lieberman Neesler	Rouge Jaune Jaune

**Remarque 17** : la coloration jaune apparaît le plus pour la plupart des essais réalisés avec les différents réactifs.

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

**Tableau 15** : Comparaison sur les résultats du dosage des échantillons de la mise au point par rapport aux substances de références.

Echantillon	Référence	Longueur d'onde en nm	Absorbance	Principe actif en %
Videx®	-	248	0,466655	100,94
Divir	-	248	0,448105	96,99
-	Didanosine	248	0,462021	100
Zeffix®	-	280	0,600145	98,87
Avolam	-	280	0,591415	97,44
-	Lamivudine	280	0,607582	100
Zerit®	-	265	0,479210	105,78
Stavir	-	265	0,478525	105,63
-	Stavudine	265	0,452678	100
Retrovir®	-	267	0,377740	99,37
Aviroz	-	267	0,381057	99,76
-	Zidovudine	267	0,382295	100
Viramune®	-	285	0,284835	99,59
Nevipan	-	285	0,282125	98,64
-	Nevirapine	285	0,285658	100
Stocrin®	-	267	0,547285	96,69
-	Efavirenz	267	0,566393	100
Viracept®	-	250	0,112945	100,84
-	Nelfinavir	250	0,119983	100
Crixivan®	-	260	0,103265	96,50
Indivan	-	260	0,107050	100,07
-	Indinavir	260	0,107348	100

**Remarque 18** : les concentrations en principe actif des différents échantillons de la mise au point sont conformes suivant les normes de qualité définies dans les différents certificats d'analyse élaborés par les fournisseurs.

### **4.4 Protocole d'analyse spectrophotométrique de huit molécules**

#### **4.4.1 Lamivudine**

**a. Forme : Comprimé, sirop.**

**b. Caractère organoleptique: Décrire l'aspect et la couleur du comprimé ou du sirop.**

**c. Réactifs**

- Solution orale contenant 10 mg de lamivudine ;
- Poudre contenant 10 mg de la lamivudine ;
- Acide chlorhydrique 0.1 N ;
- Ether diéthylique.

**d. Matériels et appareillages**

- Balance de précision ;
- Mortier ;
- Fioles jaugées de 10 ml, 100 ml ; 20ml
- Pipettes de 1ml, 2ml
- Spectrophotomètre U.V ;
- Hotte 1EL-02-046.

**e. Dosage :**

✓ **Principe**

- Dosage du comprimé

Dissolution de la lamivudine en milieu acide chlorhydrique 0,1N puis dosage spectrophotométrique en lumière U.V/Visible

✓ **Mode opératoire**

- Solution essai

Effectuer l'essai en double détermination.

A l'aide d'un mortier et d'un pilon réduire en poudre très fine les comprimés, prélever une quantité de poudre d'essai équivalent à 10 mg de lamivudine, dissoudre la prise d'essai dans une fiole jaugée de 100ml avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N, puis compléter au trait de jauge avec le même solvant. Prélever 1 ml de cette solution et diluer dans une fiole de 10 ml jusqu'au volume avec le même solvant (HCl 0,1N).

✓ **Spectrophotomètre U.V/Visible**

Déterminer l'absorbance de la solution finale à  $\lambda$  max de 280 nm par rapport à la solution d'acide chlorhydrique 0,1N.

**f. Résultats**

La teneur en lamivudine exprimée en mg/Cp est donnée par l'expression :

$$\frac{DOE}{DOT} \times \frac{PM}{PE} \times 10 \times F$$

OÙ

DOE = Absorbance de la solution d'essai

DOT = Absorbance de la solution de référence de concentration 0,01mg/ml

PE = Prise d'essai

F= Coefficient de dilution de la solution d'essai (F= 1000)

PM = Poids moyen du comprimé

- Dosage du sirop

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

### **✓ Principe**

Dissolution de la lamivudine en milieu acide chlorhydrique 0.1N puis extraction de la matière grasse (sucre) et dosage spectrophotométrique en lumière UV/Visible

### **✓ Mode opératoire**

- Solution essai

Faites l'essai en double détermination.

Prélever une quantité de sirop équivalant à 10 mg de lamivudine. Placer la prise d'essai dans une ampoule à décanter. Ajouter 50ml de HCl 0,1N et agiter.

Procéder à un lavage de la solution avec de l'éther diéthylique, récupérer la phase du solvant de dissolution (HCl 0,1N) dans une fiole jaugée de 100ml. Compléter au volume avec le même solvant puis prélever 1ml de la solution précédente, le diluer dans une fiole jaugée de 10 ml jusqu'au volume avec le même solvant.

### **g. Résultats :**

La teneur en lamivudine exprimée en mg /ml est donnée par l'expression :

$$\frac{DOE}{DOT} \times 10 \times F \times V = \text{mg/Vml}$$

OÙ

V = volume de sirop contenant le mg de lamivudine exprimé

F = Coefficient de dilution de la solution d'essai (F = 1000)

## **4.4.2 Nevirapine**

### **a. Forme : Comprimé, Sirop.**

### **b. Caractère organoleptique :**

Décrire l'aspect et la couleur du comprimé, ou sirop.

### **c. Réactifs**

- Poudre contenant 10mg de Névirapine.
- Solution orale contenant 10mg de Névirapine.
- Méthanol pour analyse.
- Soude (NaOH) 0,1N.
- Ether diéthylique pour analyse.

### **d. Matériels et appareillages**

Ils sont identiques à ceux utilisés dans l'étude de la lamivudine.

## Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV

### e. Dosages :

#### ✓ Principe

- Dosage du comprimé

Dissolution de Névirapine avec du méthanol puis dosage spectrophotométrie.

#### ✓ Mode opératoire

Solution Essai

Effectuer l'essai en double détermination.

Introduire une prise d'essai exactement pesée équivalent à 10 mg de Névirapine dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre la prise d'essai avec du méthanol.

Compléter au trait de jaugé la fiole avec le même solvant, puis diluer au 10<sup>ème</sup> la solution précédente. Compléter au trait de jauge la fiole avec le même solvant.

#### ✓ Spectrophotométrie UV/Visible

Détermination de l'absorbance de la solution finale au maximum de 285 nm par rapport au méthanol.

### f. Résultats

La teneur en Névirapine exprimée en mg/cp rapportée à la masse moyenne est donnée par l'expression :

$$\frac{DOE}{DOT} \times \frac{PM}{PE} \times 10 \times F = \text{mg/comprimé}$$

#### ✓ Principe

- Dosage du sirop

Dissolution de la Névirapine dans une solution de soude 0,1N puis extraction et le dosage par spectrophotométrie UV/Visible.

#### ✓ Mode opératoire

L'essai est réalisé en double détermination.

Dans une ampoule à décanter mesurer environ 20ml de soude (NaOH) 0,1N, puis ajouter une prise d'essai correspondant à 10mg de Névirapine, ajouter environ 20ml d'éther diéthylique et agiter pendant environ 5mn. Laisser décanter la solution. Récupérer la phase étherée, puis l'évaporer à sec. Reprendre le résidu sec avec du méthanol dans une fiole jaugée de 100ml. Compléter au volume avec le même solvant, puis diluer au quart dans une fiole jaugée de 10ml et compléter au trait de jauge avec le même méthanol.

**g. Résultat**

La teneur en Névirapine exprimée en mg/Vml est donnée par :

$$\frac{DOE}{DOT} \times 10 \times F \times V = \text{mg/Vml}$$

OÙ

V=Volume de sirop correspondant au mg/ml exprimé

**4.4.3 Nelfinavir**

**a. Forme : poudre pour solution buvable.**

**b. Caractères organoleptiques**

Décrire l'aspect et la couleur de la poudre.

**c. Réactifs**

- Poudre contenant 10 mg de nelfinavir.
- méthanol/eau distillée.
- HCl 0,1N.

**d. Matériels et appareillage**

Ils sont identiques à ceux de l'étude sur Lamivudine.

**e. Dosage**

✓ **Principe**

Dissolution de Nelfinavir dans du méthanol/eau 75/25 ou avec HCl 0,1N puis dosage spectrophotométrique en UV/Visible

✓ **Méthode préparatoire**

L'essai se fait en double détermination.

A l'aide d'un mortier réduire la poudre très finie, puis introduire dans une fiole volumétrique de 100 ml, la prise d'essai de poudre correspondant à 10 mg de Nelfinavir. Dissoudre soit avec HCl 0,1N, soit avec le mélange de solvant méthanol/eau.

Compléter au volume la fiole avec le même solvant choisi.

Prélever 1 ml de cette solution dans une fiole jaugée de 10 ml, puis compléter au trait de jauge de la fiole avec le solvant de dissolution.

✓ **Spectrophotométrie UV**

Déterminer l'absorbance de la solution finale au maximum de 254nm par rapport au solvant méthanol/eau ou à 250nm par rapport à HCl 0,1N.

**f. Résultats**

La teneur en Nelfinavir exprimée en mg/g est donnée par l'expression:

$$\frac{DOE}{DOT} \times M \times F = Mmg/g$$

OÙ

M = quantité de principe actif exprimé en mg

**4.4.4 Stavudine**

**a. Forme : Comprimé**

**b. Caractères organoleptiques :**

Décrire l'aspect et la couleur du comprimé.

**c. Réactifs**

- Poudre de comprimé contenant 10 mg de Stavudine.
- Acide chlorhydrique 0,1N.

**d. Matériels et appareillages**

Même que ceux utilisés dans l'étude du Nelfinavir.

**e. Dosage**

✓ **Principe :**

Dissolution de la Stavudine avec de l'acide chlorhydrique 0,1N puis dosage au spectrophotomètre UV/V.

✓ **Mode opératoire**

Effectuer l'essai en double détermination.

Réduire le comprimé en poudre fine à l'aide d'un mortier et d'un pilon.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire une prise d'essai de poudre équivalente à 10 mg de Stavudine. Dissoudre avec de l'acide chlorhydrique 0,1N. Compléter au trait de jauge la fiole avec le même solvant. Prélever 1 ml de cette solution dans une fiole jaugée de 10 ml et compléter au volume avec l'acide chlorhydrique 0,1 N.

✓ **Spectrophotomètre UV/V**

Effectuer la mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 265nm.

**f. Résultats**

La teneur en Stavudine, exprimée en mg/cp, est donnée par :

$$\frac{DOE}{DOT} \times \frac{PM}{PE} \times 10 \times F = mg/comprimé$$

#### **4.4.5 Indinavir**

**a. Forme : Gélule.**

**b. Caractères organoleptiques :**

Décrire l'aspect et la couleur de la Gélule.

**c. Réactifs**

- Poudre contenant 10 mg d'Indinavir.
- Acide chlorhydrique 0,1N.

**d. Matériels et appareillages**

Identique à ceux de l'étude sur la Lamivudine

**e. Dosage**

✓ **Principe**

Dissolution de la poudre d'Indinavir avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N puis suivi du dosage au spectrophotomètre UV/V.

✓ **Mode opératoire**

Effectuer toujours l'essai en double détermination.

A l'aide d'un mortier et d'un pilon rendre la poudre fine.

Introduire dans une fiole jaugée de 100 ml, une prise d'essai équivalent à 10 mg d'Indinavir. Dissoudre avec de l'acide chlorhydrique 0,1N. Compléter au volume la fiole. Prélever 1 ml de cette solution dans une fiole volumétrique de 10 ml et compléter au volume avec le même solvant.

Passer au spectrophotomètre à l'UV/V la solution finale à la longueur maximale

$\lambda = 260 \text{ nm}$ .

**f. Résultats**

La teneur en Indinavir exprimée en mg/gélule est représentée par :

$$\frac{\text{DOE}}{\text{DOT}} \times \frac{\text{PM}}{\text{PE}} \times 10 \times F = \text{mg/gélule}$$

#### **4.4.6 Zidovudine**

**a. Forme:**

Gélule, sirop.

**b. Caractères organoleptiques :**

Décrire l'aspect et la couleur de gélule.

**c. Réactifs**

- Solution orale contenant 10 mg de Zidovudine.
- Poudre contenant 10mg de Zidovudine
- Eau distillée.
- Ether diéthylique.

**d. Matériels et appareillages.**

- Balance de précision.
- Mortier.
- Fioles jaugées de 100ml, 10 ml, 20ml.
- Pipettes de 1 ml, 2 ml.
- Spectrophotomètre UV/Visible.
- Hotte 1 el -02-046.

**e. Dosage**

✓ **Principe**

- Dosage : gélule.

Dissolution de la Zidovudine en milieu aqueux puis dosage par spectrophotométrie en lumière UV/Visible.

✓ **Mode opératoire**

- Solution essai.
- Effectuer l'essai en double détermination.
- L'aide d'un mortier et d'un pilon réduire en poudre fine, le contenu des gélules.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire une prise d'essai de poudre exactement pesée voisine de 10 mg de Zidovudine. Dissoudre dans de l'eau distillée. Compléter au trait de jauge avec le même solvant.

Prélever 1 ml de la solution précédente, diluer dans une fiole de 10 ml et compléter au volume avec le même solvant.

Déterminer l'absorbance de la solution finale au maximum de 267 nm par rapport à la solution aqueuse.

**f. Résultats**

La teneur en Zidovudine exprimée en mg/gélule rapportée à la masse moyenne est donnée par l'expression :

$$\frac{DOE}{DOT} \times \frac{PM}{PE} \times 10 \times F = \text{mg/gélule}$$

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

- Dosage : sirop

Dissolution de la Zidovudine en milieu aqueux, puis extraction et dosage par spectrophotométrie en lumière UV

### ✓ **Mode opératoire**

Placer dans une ampoule à décanter 50 ml d'eau distillée. Ajouter la prise d'essai de sirop équivalent à 10 mg de Zidovudine au contenu de l'ampoule à décanter. Agiter, laver successivement deux fois avec de l'éther diéthylique. Récupérer la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au volume avec le même solvant, puis prélever 1 ml de cette solution et compléter au trait de jauge dans une fiole de 10 ml avec le même solvant.

### **g. Résultat**

La teneur en Zidovudine est donnée par l'expression :

$$\frac{DOE}{DOT} \times 10 \times F \times V = \text{mg/Vml}$$

OÙ

V = Volume de sirop contenant le mg de Zidovudine exprimé.

## **4.4.7 Didanosine**

### **a. Forme :**

Comprimé, poudre pour solution buvable

### **b. Caractère organoleptiques :**

Décrire l'aspect et la couleur du comprimé et de la poudre pour solution buvable .

### **c. Dosage**

#### ✓ **Principe :**

Dissolution de la didanosine en milieu HCl 0,1N, puis dosage spectrophotométrique à l'UV/Visible.

#### ✓ **Mode opératoire**

- Solution essai

Effectuer l'essai en double détermination.

A l'aide d'un mortier et d'un pilon réduire en poudre fine le comprimé. Introduire une prise d'essai exactement pesée voisine de 10mg de Didanosine, dans une fiole volumétrique de 100ml. Dissoudre dans HCl 0,1N et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

Prélever 1ml de la solution précédent, diluer dans une fiole de 10ml et compléter au trait de jauge avec HCl0, 1N.

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

### **✓ Spectrophotométrie UV/Visible**

Déterminer l'absorbance de la solution finale au maximum de 248 nm par rapport HCl 0,1N.

#### **d. Résultats**

La teneur en didanosine exprimée en mg/cp est représentée par :

$$\frac{DOE}{DOT} \times \frac{PM}{PE} \times 10 \times F = \text{mg/comprimé}$$

### **4.4.8 Efavirenz**

#### **a. Forme:**

Comprimé

#### **b. Caractère organoleptiques:**

Décrire l'aspect et la couleur du comprimé.

#### **c. Réactif :**

- Poudre contenant 10 mg d'efavirenz.
- Eau distillée.
- Méthanol.
- NaOH 0,1N.

#### **d. Dosage**

##### **✓ Principe**

Dissolution de l'efavirenz en milieu NaOH 0,1N ou méthanol/eau .Puis dosage au spectrophotomètre en lumière UV.

##### **✓ Mode opératoire**

- Solution d'essai

Effectuer l'essai en double déterminations.

A l'aide d'un mortier et d'un pilon réduire en poudre très fine les comprimés. Dans une fiole volumétrique de 100 ml, introduire une prise d'essai exactement pesée voisine de 10 mg de l'efavirenz. Dissoudre la PE soit avec le solvant NaOH 0,1N, soit avec le mélange de solvant méthanol/eau (75/25) et compléter au trait de jauge avec le solvant de dissolution. Prélever de cette solution 1ml dans une fiole jaugée de 10 ml, diluer et compléter au volume la fiole avec le même solvant.

##### **✓ Spectrophotomètre UV/Visible**

Déterminer l'absorbance de la solution finale à  $\lambda$  max = 247nm par rapport au méthanol/eau ou 267 nm par rapport à NaOH 0,1N.

**e. Résultats**

La teneur en Efavirenz exprimée en mg/cp est représentée par :

$$\frac{DOE}{DOT} \times \frac{PM}{PE} \times 10 \times F = \text{mg/comprimé}$$

**4.5 Dosage et identification des principes actifs dans le produit fini :  
chromatographie liquide haute performance**

**4.5.1 Mise au point de la séparation :**

**4.5.1.1 Préparation des solutions.**

**a. Préparation du tampon phosphate**

Placer 50 ml de potassium phosphate monobasique dans une fiole jaugée de 200 ml et ajouter la solution de NaOH 1N au volume indiqué : pH = 7, NaOH = 29,1 ; ou pH = 7,2, NaOH = 34,7. Compléter au trait de jauge la fiole avec de l'eau.

**b. Préparation potassium phosphate, monobasique 0,2 M**

Dissolvez 27,22 g de potassium phosphate monobasique (KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dans l'eau, et Diluer au volume dans une fiole de 1000 ml avec de l'eau.

**c. Solutions d'essais :**

Une détermination des poids moyens à été réalisée pour pouvoir préparer des solutions à des concentrations théoriques.

Suivant les poids moyens, on calcule en fonction du dosage indiqué par le fabricant la quantité théorique de principe actif contenu dans la prise d'essai (PE). Les PE sont dissoutes dans 50ml d'acetonitrile et soumises à 20 minutes d'agitation magnétique. Puis les solutions sont décantées et le surnageant est filtré sur filtre WHATMAN. Puis on réalise une dissolution en prélevant 10ml de la solution précédente dans une fiole de 100ml et on complète au volume la fiole avec la phase mobile.

- La teneur en principe actif exprimée en %/comprime est représentée par la formule : Zidovudine :  $1000C \frac{ru}{rs}$

OÙ

C = concentration en mg/ml de Zidovudine contenue dans la préparation du standard.

ru et rs ; les aires obtenues de la préparation respective de l'essai et du standard.

### **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

- Lamivudine :  $1000C(ru/rs) \times 2$

OÙ

C = concentration en mg/ml de Lamivudine contenue dans la préparation standard.

**Tableau 15** : Prises d'essai et solutions réalisées :

Produits	Poids moyen en mg	Dosage en mg	Prise d'essai en mg	Conc finale en Pa mg/ml
Lamivudine	282,59	150	47,1	0,05
Zidovudine	373,16	300	62,2	0,1
Lamivudine+ Zidovudine	706,45	150+ 300	117,7	0,05+ 0,1

#### **4.5.1.2 Travail en mode gradient sur l'association AZT- 3TC.**

Le travail à ce niveau a consisté à définir les conditions pour la séparation de Lamivudine, Zidovudine. Pour cela nous-nous sommes inspiré de l'étude menée par Gueutin Claire et Karolak Sara sur l'identification de nos différentes molécules.

L'objectif de notre étude était de trouver les conditions chromatographiques optimales pour pouvoir identifier les deux molécules, puis les doser.

Nous avons réalisé ceci par chromatographie liquide haute performance. La phase stationnaire était composée d'une silice greffée et la phase mobile était un mélange d'acétonitrile et tampon phosphaté pH = 7,17.

#### **4.5.1.3 Conditions chromatographiques :**

- Phase mobile: Acétonitrile/tampon phosphaté pH = 7,17.
- Détection : UV 260nm ;
- Débit : 1ml/minute ;
- Volume d'injection : 10µl ;
- Température colonne : 37° ;
- Colonne 4,6mmx25cm C18 ;
- Gradient d'élution = phase mobile

Tampon phosphate 92 volumes ;

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

Acetonitrile 08 volume

**Tableau16 : Résultats**

Molécule	Tr en minute	Aire	Concentration en mg/comprime
Lamivudine std	3,78	871,08295	150
Zidovudine std	10,04	1980,33472	300
Zidovudine 300+	9,97	2006,73621	303,99
Lamivudine 150	3,77	939,77942	161,88

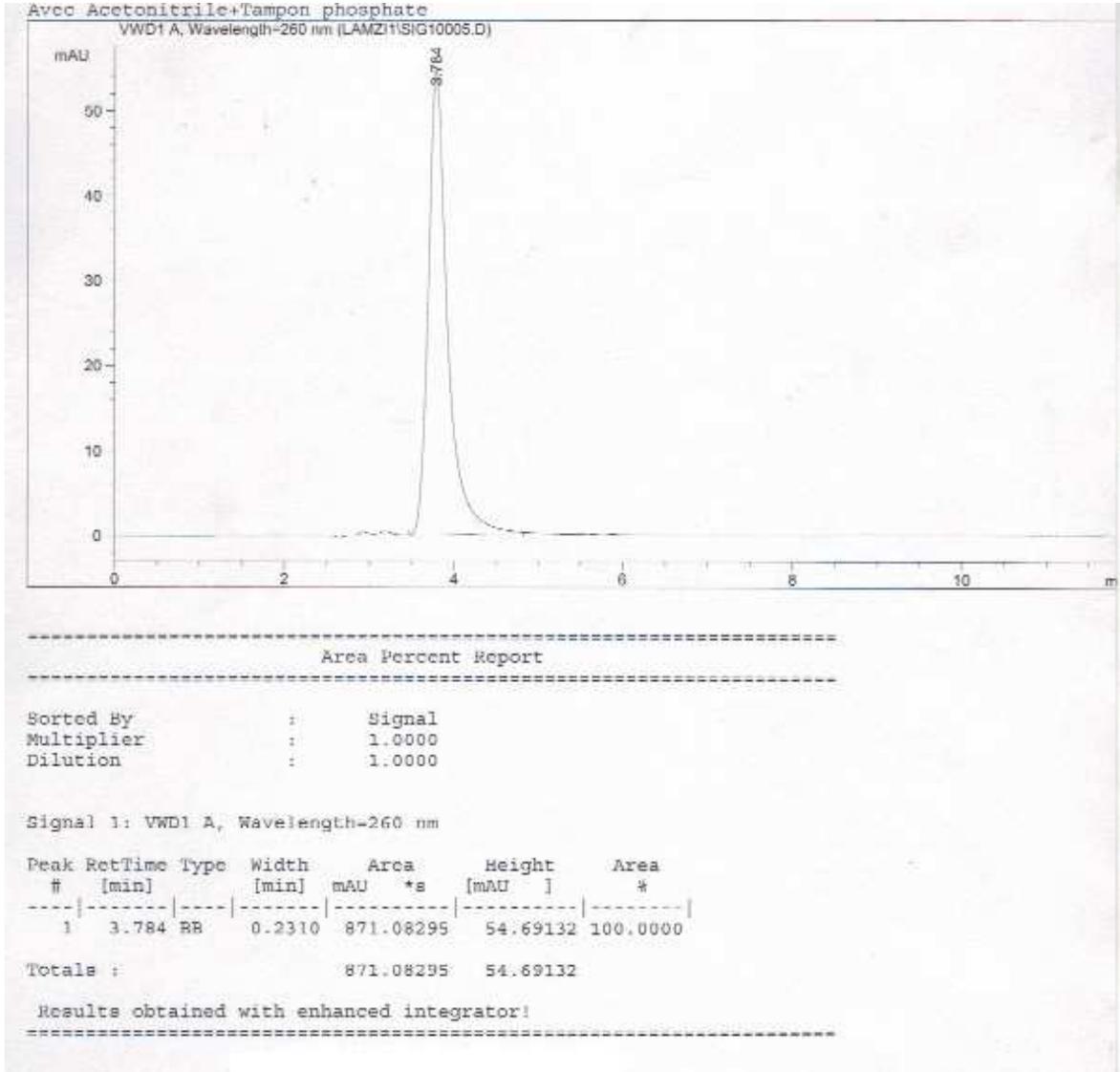
**Remarque 19** : les valeurs exprimées par les temps de rétention et les aires des pics de la forme associée zidovudine + lamivudine sont très voisines de celles obtenues par les standards.

De même on remarque que les temps de rétention des standards sont légèrement supérieurs à ceux de l'association, mais les aires sont légèrement inférieures à celles de l'association.

**Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

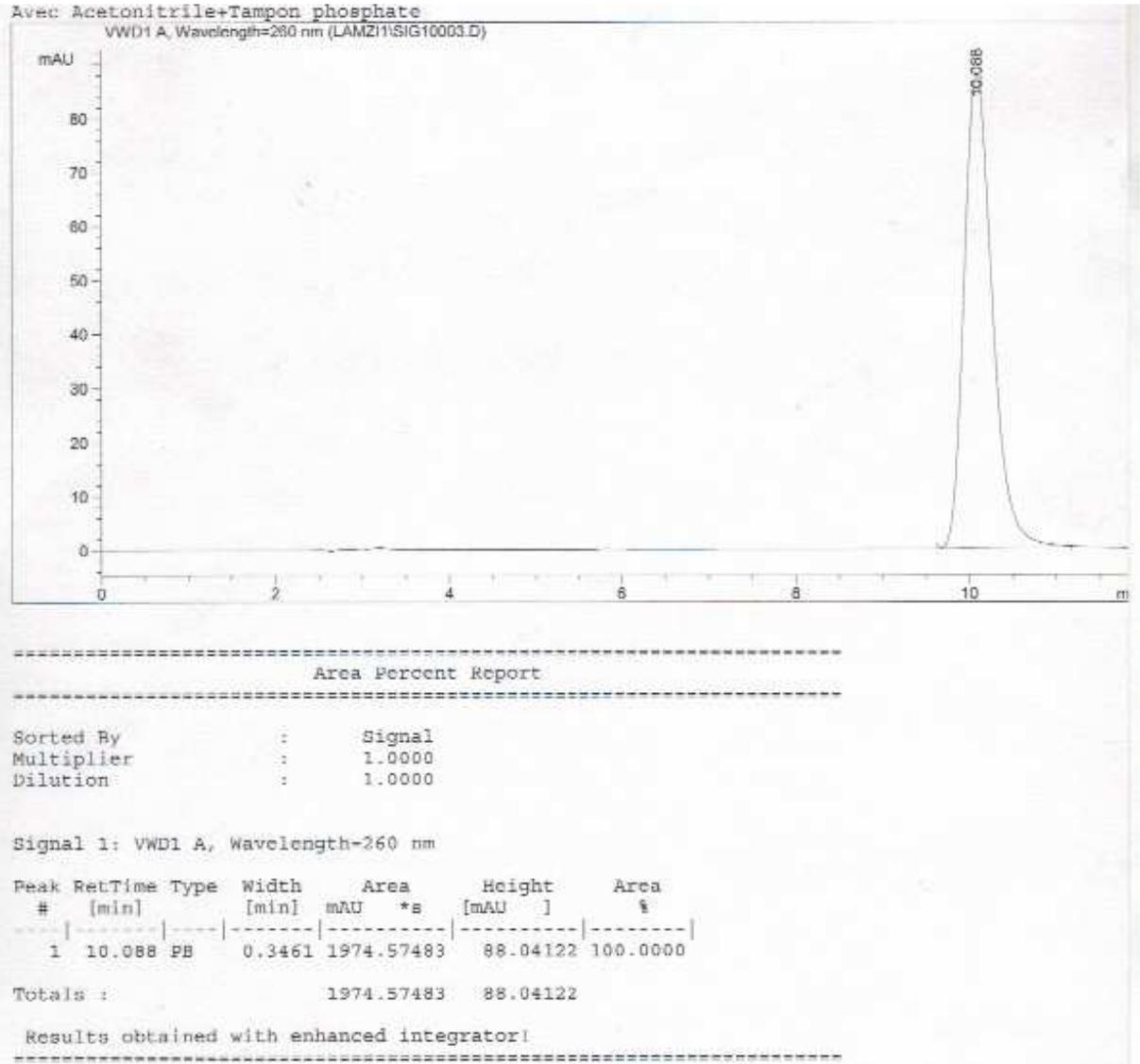
**4.5.2 Les chromatogrammes des références et celui de l'association**

**a. Lamivudine**



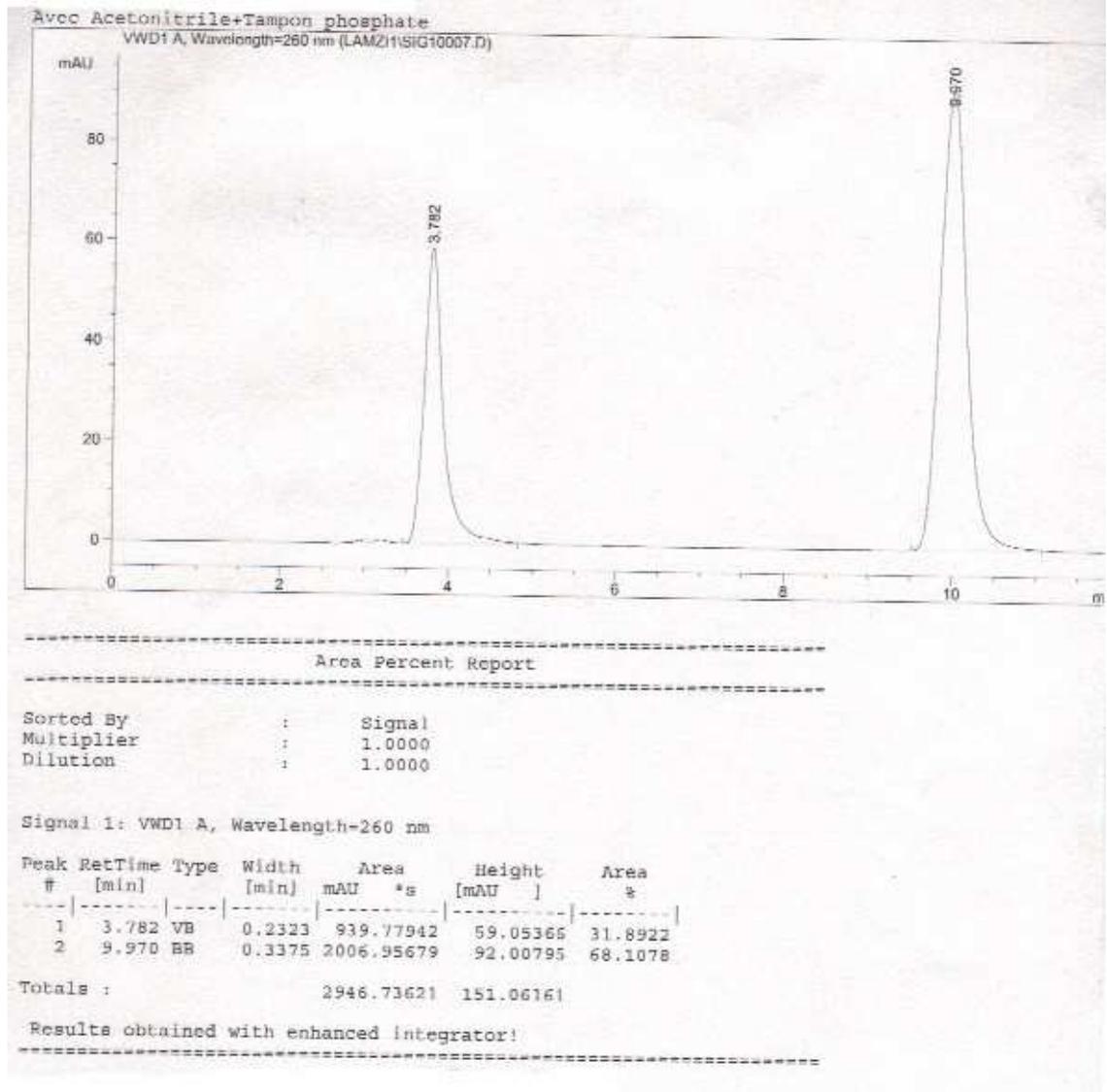
**Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

**b. Zidovudine**



**Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

**c. Lamivudine + Zidovudine**



## **V. COMMENTAIRE - DISCUSSION**

Ce travail propose des méthodes de dosage et d'identification de neuf molécules ARV disponibles au Mali dans les différents sites de distribution.

Les dosages au spectrophotomètre à l'UV/Visible de huit molécules (Didanosine, Lamivudine, Zidovudine, Stavudine, Nevirapine, Nelfinavir, Efavirenz, Indinavir) ont été réalisés. Ont été aussi réalisés la chromatographie liquide haute performance (HPLC) de trois molécules (Zidovudine, Lamivudine et l'association Zidovudine + Lamivudine). Pour l'identification, diverses méthodes ont été utilisées ; la chromatographie sur couche mince, les tests de coloration et les spectres à l'UV/V.

Au cours de cette étude nous avons été confrontés à certaines difficultés, qui ont été, l'absence de documentation relative aux contrôles de qualité de nos différentes molécules par la méthode spectrophotométrie UV/V et la réticence constatée des demandeurs d'autorisation de mise sur le marché à fournir les substances de référence en même temps que les produits ARV qui seront soumis à l'analyse.

Les méthodes ainsi proposées se fondent sur des bases scientifiques collectées dans les ouvrages spécialisés.

Pour ce faire, les méthodes utilisées pour le contrôle de qualité de nos médicaments ont été la spectrophotométrie UV/V et la chromatographie liquide haute performance pour le dosage; la Chromatographie sur couche mince, les tests de coloration et les spectres à l'UV/V pour l'identification.

Contrairement à l'étude de validation menée par K.Tilier, F.Lagrange, F. Péhourcq, L. Edno-Mcheik, N. Molimard tous du laboratoire de pharmacologie clinique et toxicologie, Hôpital Pellegrin et Université Victor Ségalen, Bordeaux, France, sur deux paramètres (répétabilité la reproductibilité) pour le dosage plasmatique des ARV à l'HPLC, notre étude a été effectuée sur six paramètres de validation y compris les deux paramètres de l'étude sur la validation du dosage plasmatique.

**a. Méthode d'analyse**

✓ **Spectrophotomètre dans l'UV/visible**

C'est une méthode de choix et plus fiable que les méthodes chimiques. Cependant, il faut être précis dans les dilutions et bien nettoyer les cuves, de plus éviter des erreurs de pipetage et préparer les solutions en double. Elle exige beaucoup de précaution pour pouvoir respecter les conditions de validité de la loi de Beer Lambert qui sont :

- Une lumière monochromatique ;
- Une solution limpide ;
- Une faible concentration de solution ;
- Des molécules stables en solution et sous l'effet de l'irradiation.

La spectrophotométrie UV/V est utilisée aussi bien pour l'analyse qualitative que quantitative.

✓ **Chromatographie liquide haute performance (HPLC).**

La chromatographie, méthode d'analyse aujourd'hui quasi incontournable, permet d'effectuer des analyses de tout type de substances à divers degrés d'état de matière : gaz, liquide, solide, à condition que dans ce dernier cas la vaporisation soit possible sans décomposition à différentes températures. Dans l'HPLC, l'échantillon préparé sous forme liquide, est injecté dans un système constitué d'une colonne remplie d'une substance susceptible d'effectuer la séparation des différents composants. Ceux-ci sont mis en évidence dans leur ordre de sortie de la colonne par un système de détection adéquat, dont les signaux, à travers un numériseur (convertisseur analogique/numérique) sont dirigés sur un intégrateur pour analyse quantitative des composants correspondants.

La technique de chromatographie est utilisée aussi bien pour les analyses quantitatives que qualitatives [11].

Les caractéristiques de performances appliquées aux méthodes analytiques ont fait l'objet d'une évaluation fondée sur des données expérimentales, ce qui a permis d'apporter la preuve que nos méthodes d'analyse s'appliquent bien aux produits analysés, notamment il s'agit de nos études menées sur la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, la sensibilité, la spécificité, le seuil de détection et la stabilité des molécules dans les solutions respectives.

**b. Résultats**

Au terme de notre travail sur les produits finis et la validation des méthodes d'analyse avec les substances de référence, nous avons constaté que les excipients contenus dans les produits n'avaient pas de propriétés spectrales importantes interférant la détection des principes actifs en UV/V, ce qui a été démontré après un certain nombre d'essai sur de multiple lots de produits finis conformément à la monographie d'analyse retenue après validation.

Ainsi 62 échantillons ont été analysés, dont 59 échantillons dosés par la méthode spectrophotométrique et 03 par HPLC.

Sur les 59 échantillons analysés par la méthode spectrophotométrique, 10 échantillons sont représentés par la didanosine, 07 par lamivudine, 06 par la stavudine, 07 par la zidovudine, 06 par la nevirapine, 17 par l' Indinavir, 03 par l'efavirenz et 03 par le nelfinavir.

Nous avons obtenu pour chacun des échantillons analysés les spectres des bandes d'absorption de densités optiques convenables permettant l'identification et le dosage plus aisé de chacune des bandes d'absorption.

Les méthodes analytiques de nos différentes recherches au spectrophotomètre sont linéaires sur une large gamme concentration, répétables avec un CV inférieur à 3% pour l'ensemble des molécules de l'essai. Ce sont des méthodes reproductibles. Elles permettent de doser et d'identifier les principes actifs contenus dans la formulation des médicaments ARV de notre étude. Ce qui présente un intérêt non négligeable pour la qualité de ces médicaments, qui sera d'un appui non négligeable pour le suivi thérapeutique de ces patients traités par les médicaments de meilleure qualité.

## **Discussions**

Compte tenu de nos moyens limités, notre étude n'a pas permis de définir les normes de qualité de nos différents produits. Pour ce fait nous nous sommes référé aux normes de qualité avancées dans les certificats d'analyse des fournisseurs de nos différents produits au cours des contrôles de qualité effectués par l' HPLC. De même notre étude ne nous a pas permis d'évaluer certains paramètres de la validation (robustesse, exactitude et seuil de quantification).

La spectrophotométrie UV/Visible étant une méthode analytique qui est plutôt orientée sur les groupements fonctionnels, elle apparaît de ce fait un peu limitée dans la séparation des molécules à la structure voisine (cas de l'association lamivudine+ zidovudine) que la chromatographie liquide haute performance, mais elle reste pour les pays en voie de développement un des moyens le mieux disponible en terme de coût, de rapidité, de réalisation et de fiabilité pour le contrôle de qualité des médicaments.

Cette méthode apparaît insuffisant pour le dosage de la forme associée AZT+3TC, puisque les bandes d'absorption ne se séparent pas à l'analyse pour la raison que les deux molécules absorbent à des longueurs d'onde très proches.

Cependant pour une approche quantitative, la CCM resterait malgré sa faible fiabilité une méthode disponible et très maniable pour réaliser l'étude semi quantitative et la coloration des spots par rapport à un témoin.

## **VI. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

Le but de la mise au point de ces méthodes de contrôle de qualité des médicaments ARV répond à l'un des soucis légitimes du LNS de garantir la qualité des médicaments ARV par des méthodes simples, fiables, reproductibles et réalisables dans les conditions bien propres à nos réalités.

Les méthodes analytiques ainsi élaborées contribuent à apporter la preuve que la spectrophotométrie UV/Visible est un moyen sûr et fort utile pour assainir nos marchés des médicaments ARV de la contrefaçon et de garantir la qualité des médicaments.

Ce sont des méthodes qui sont économiques, simples, fiables et réalisées suivant les conditions d'analyse du Laboratoire National de la Santé.

### **Recommandations**

Au terme de notre étude nous formulons les recommandations suivantes :

#### **✓ Inspection de santé**

Adopter une politique de contrôle de qualité systématique de médicaments ARV avant la vente.

#### **✓ Pharmacie Populaire du Mali (PPM)**

Adopter des politiques d'achat des médicaments ARV utilisés au Mali.

#### **✓ Direction de Pharmacie et de Médicament (DPM)**

Renforcer leur politique au près des demandeurs d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour ce qui concerne l'octroi des substances de référence en même temps que les produits ARV soumis aux contrôles de qualité.

#### **✓ Laboratoire National de Santé**

Poursuivre des études de ce genre pour tous les autres médicaments ARV non retenus par notre étude.

Continuer à veiller sur les principes de la bonne pratique de laboratoire.

Assurer la formation continue du personnel en vue du perfectionnement.

#### **✓ Industriels**

De veiller au respect des bonnes pratiques de fabrication en vue d'assurer une meilleure qualité des produits fabriqués.

## **VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **7.1 Actualité innovation médecine, BMS**

Comment fonctionne l'inhibition de la transcriptase inverse du virus de L'immunodéficience humaine par ddl (Videx) ou d4T (Zerit) , extrait N° 56, 01/1999

### **7.2 Alzouma Abdou Salamatou.**

Etude comparative des politiques de gestion des antiretroviraux dans cinq pays de l'Afrique de l'ouest : Sénégal, Niger, Mali, Burkina Faso, côte d'ivoire.  
Thèse de pharmacie, BKO 2002, 150 pages N°52.

### **7.3 Assurer la qualité des médicaments dans les échanges internationaux.**

Rapport d'un colloque organisé par la fédération internationale de l'industrie du médicament (FILM) avec le bureau régional Africain de l'OMS (OMS-Afro) du 03 au 05 décembre 1990 à Lomé au Togo.

### **7.4 Comité OMS d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques.**

Validation des méthodes d'analyse des produits pharmaceutiques. Série de rapports techniques, N° 823. Genève, 1992

### **7.5 Dariosecq J –M, Girard P-M.**

Infection à VIH. Mémento thérapeutique 1999, édition Doin, Paris. 317.

### **7.6 Dembélé S .O**

Problématique de la qualité des médicaments au Mali : cas de l'ibuprofène.  
Thèse pharmacie, BKO, 1998, 95 pages, N°23.

### **7.7 Drissa Bagayoko**

Mise au point et validation au dosage par spectrophotométrie UV/ visible de deux spécialités essentielles fabriquées à l'UMPP, Aspirine et prométhazine.  
Thèse pharmacie 1995, 62pages, N°13.

### **7.8 E –MED-OMS**

Action contre les médicaments de qualité inférieure et contrefaits 11 Novembre 2003.

## **Mise au point des méthodes de dosage et d'identification des ARV**

### **7.9 Françoise Vincent - Ballereau Luc Le quay, Louis, Gomes, Mavoun, Danielle Rozel, Anne – Valerie.**

Technique simple de contrôle et d'étude de stabilité de médicaments essentiels dans les pays en développement.

### **7.10 Guedj.R**

Mode d'action des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase reverse du VIH. Virologie Mars 1999,(3),(Spécial) :17-27.

### **7.11 Gueutin Claire et Karolak Sara**

Mise au point de méthode d'identification des antiretroviraux.

Faculté de pharmacie – Université Paris11. Rapport de Stage juillet 2004

### **7.12 Mouchen M, Nkoghe.D, Leonard ,Demonty J.**

Pharma cliniques: Comment je traite une infection par le VIH: IN: Bases pathogéniques des choix thérapeutiques, Rev Med, Liège, 1997. 622-624.

### **7.13 Dr Ducourneau.**

Actualité sur l'infection à VIH, Objectif médicale – N° 668, 5 Mars 1997.

### **7.14 OMS**

La qualité des médicaments sur le marché pharmaceutique africain.

Etude analytique dans trois pays Cameroun, Madagascar, Tchad .1995

### **7.15 OMS**

Utilisation des médicaments essentiels 30<sup>eme</sup> rapport du comité d'experts de l'OMS.

Serie de rapports techniques, Genève, 1988.

### **7.16 OMS**

Assurance qualité des produits pharmaceutiques. Recueil des directives et d'autres documents. Volume 1, Genève, 1998.

### **7.17 Pharmacopée Européenne**

4eme édition 2002 pages 37

**7.18 Pharmacopée Internationale**

Méthode générale d'analyse 3<sup>ème</sup> édition Volume 1. OMS Genève, 1980

**7.19 Pharmacopée Internationale.**

Normes de qualité pour les substances, excipients et préparations pharmaceutiques.  
3<sup>ème</sup> édition, volume 4 OMS Genève 1994.

**7.20 Rapport de Recherche (CILSS).**

Profil démographique et socio économique du Mali. 1960 – 2000.

**7.21 Tandia Mahamadou**

Contrôle de la qualité des formes galéniques solides destinées à la voie orale au LNS. Thèse pharmacie, BKO 2002 ,109 pages, N°13.

**7.22 Trazie BI Gosse.**

Suivi de la dispensation des ARV au service de maladie infectieuse et tropicale  
CHU – Treichville d'octobre 1998 à décembre 2000. Thèse de la Pharmacie, année  
2000-2001 UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques N°563 Abidjan cÔte  
d'ivoire.

**FICHE SIGNALITIQUE**

**NOM :** TRAORE

**PRÉNOM :** Abdoulaye Sayon

**TITRE DE :** MISE AU POINT DES METHODES DE DOSAGE ET  
D'IDENTIFICATION DES MEDICAMENTS ANTIRETROVIRAUX UTILISES AU MALI

**ANNÉE UNIVERSITAIRE :** 2004 - 2005

**VILLE DE SOUTENANCE :** BAMAKO

**PAYS D'ORIGINE :** MALI

**LIEU DE DÉPÔT :** BIBLIOTHÈQUE DE LA FMPOS

**SECTEUR D'INTERET :** MEDICAMENT

## **RÉSUMÉ**

Ce travail propose, des méthodes de dosage par spectrophotométrie UV/Visible de huit molécules ARV et par chromatographie liquide haute performance (HPLC) de la forme associée AZT + 3TC et des méthodes d'identification par la chromatographie sur mince, tests coloration et suivant les spectres de chaque molécule.

Les molécules sont dosées par rapport à des substances de références après leur dissolution et leur dilution dans différents solvants définis dans le protocole d'analyse des molécules.

La phase mobile pour le dosage à la chromatographie liquide haute performance (HPLC) est un gradient d'acetonitrile et de tampon phosphaté de pH = 7,17 pour un débit de 1ml / min.

La détection est réalisée à la longueur d'onde de 260 nm.

Les méthodes analytiques sont linéaires avec un coefficient de variation CV < 2% pour l'ensemble des molécules, elles sont reproductibles et sensibles.

Ce sont des méthodes permettant une détermination simple des antirétroviraux sans interférence avec les excipients.