

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS	3
I. MEDICAMENT GENERIQUE.....	3
1. Définition	3
2. Types	3
3. Dénominations	4
4. Essor des médicaments génériques	4
II. DROIT DE SUBSTITUTION	5
1. Définition	5
2. Groupe générique	6
III. BIOEQUIVALENCE.....	6
1. Définition	6
2. Etude de bioéquivalence.....	7
3. Détermination des concentrations plasmatiques	7
IV. METHODES D'ANALYSE	8
1. Techniques chromatographiques.....	8
1.1. Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP).....	9
1.2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	9
2. Spectrométrie de masse (SM), source ESI.....	10
3. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	11
V. AMLODIPINE	13
1. Structure chimique	13
2. Propriétés physico-chimiques	14
3. Mécanisme d'action pharmacologique	16
4. Effets thérapeutiques.....	16
5. Propriétés pharmacocinétiques.....	17
6. Médicaments à base d'amlodipine enregistrés à Madagascar.....	17

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS..... 22

I. METHODES..... 22

1. Mise au point d'une méthode d'extraction 22
 - 1.1. Protocole expérimental de l'extraction 22
 - 1.2. Identification de l'amlodipine extraite 26
 - 1.2.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) 26
 - 1.2.2. Spectrométrie de masse (SM)..... 27
 - 1.2.3. Spectrométrie RMN..... 27
2. Mise au point d'une méthode de dosage en CLHP couplée
au spectromètre UV-visible..... 29
3. Applications : Comparaison des PA dans les préparations galéniques..... 33
4. Expression des résultats 37
5. Analyse statistique 37
6. Limites de l'étude..... 37
7. Considérations éthiques 37

II. RESULTATS..... 38

1. Identification de l'amlodipine extraite 38
 - 1.1. CCM..... 38
 - 1.2. Spectre de masse 39
 - 1.3. Spectrométrie RMN ^1H 41
 - 1.4. Spectre RMN ^{13}C Broadband decoupling 43
2. Mise au point d'une méthode de dosage en CLHP 44
 - 2.1. Effets du système d'éluants..... 44
 - 2.2. Mise au point de la longueur d'onde de détection 47
 - 2.3. Ebauche d'une gamme étalon à $\lambda = 235 \text{ nm}$ 48
 - 2.4. Essais sur le plasma à $\lambda = 235 \text{ nm}$ 48
3. Applications : Comparaisons des PA dans les formes galéniques 49
 - 3.1. Comparaison à la balance électronique..... 49
 - 3.2. Comparaison en CLHP..... 50

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION..... 53

I. DISCUSSION 53

1. Etude des résultats des tests d'identification de l'amlodipine extraite	53
2. Etude des résultats de la mise au point d'une méthode de dosage en CLHP	57
3. Comparaison des échantillons extraits d'AMLOR [®] et AMLOPRES [®]	59
II. PERSPECTIVES	63
CONCLUSION.....	64
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Propriétés physico-chimiques de l’amlodipine.....	15
Tableau II : Liste des médicaments à base d’amlodipine enregistrés à l’AGMED	18
Tableau III : Liste des médicaments à base d’amlodipine en association fixe enregistrés à l’AGMED	20
Tableau IV : Liste des matériels utilisés pour l’extraction	23
Tableau V : Identification des spectres RMN	28
Tableau VI : Gamme étalon de l’amlodipine établie pour le calcul du coefficient de réponse K	36
Tableau VII : Fragments du produit isolé obtenus par SM.....	40
Tableau VIII : Interprétation du spectre RMN ¹ H du produit isolé.....	42
Tableau IX : Attribution des signaux du spectre RMN ¹³ C du produit	44
Tableau X : Mise en évidence de la proportionnalité du signal par rapport à la concentration à $\lambda = 235$ nm.....	48
Tableau XI : Mise en évidence de l’identification en CLHP de l’amlodipine avec le solvant S7 à $\lambda = 235$ nm	48
Tableau XII : Détermination de la masse des échantillons extraits des gélules d’AMLOR [®] et des comprimés d’AMLOPRES [®]	49
Tableau XIII : Temps de rétention (TR) des échantillons extraits d’AMLOR [®] et AMLOPRES [®] (n=3)	51
Tableau XIV : Paramètres utilisés pour le calcul du coefficient de réponse K (n=3)	51
Tableau XV : Dosage du PA des extraits issus d’AMLOR [®] et AMLOPRES [®] en CLHP	52
Tableau XVI : Comparaison des valeurs de δ ¹ H obtenus à celles du logiciel Chemdraw.....	55
Tableau XVII : Comparaison des valeurs de δ ¹³ C obtenus à celles du logiciel Chemdraw.....	56

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Cycle administratif de vie d'un médicament.....	3
Figure 2 : Evolution du marché des médicaments génériques.....	5
Figure 3 : Schéma d'une CCM.....	10
Figure 4 : Principe de l'ionisation par électrospray	10
Figure 5 : Principe de fonctionnement d'un appareil RMN.....	12
Figure 6 : Principe du déplacement chimique dans un spectre RMN.....	12
Figure 7 : Formule développée de l'amlodipine base	14
Figure 8 : Schéma d'un canal calcique voltage-dépendant lent de type L.....	16
Figure 9 : Contraction cellulaire et mécanisme d'action de l'amlodipine au niveau des CMLV	16
Figure 10 : Protocole d'extraction de l'amlodipine dans les comprimés d'AMLO DENK®	25
Figure 11 : Photo de l'appareil CLHP du LIA.....	30
Figure 12 : Mise au point de la méthode de dosage de l'amlodipine en CLHP.....	31
Figure 13 : Chromatogramme du produit obtenu à partir des comprimés d'AMLO DENK®	38
Figure 14 : Spectre de masse du produit obtenu à partir des comprimés d'AMLO DENK®	39
Figure 15 : Spectre RMN ¹ H du produit obtenu à partir des comprimés d'AMLO DENK® à 500 MHz dans CD ₃ OD	41
Figure 16 : Attribution des signaux au niveau de la structure de l'amlodipine	42
Figure 17 : Spectre RMN ¹³ C à 100 MHz du produit obtenu à partir des comprimés d'AMLO DENK® dans CD ₃ OD.....	43
Figure 18 : Formule développée et numérotation des atomes de l'amlodipine	44
Figure 19 : Chromatogrammes obtenus en fonction du système d'éluants (A : injection du méthanol ; B et C : 1 ^{ère} et 2 ^{ème} injection)...	46
Figure 20 : Mise au point de la longueur d'onde pour l'analyse CLHP de l'échantillon élué avec S7 (Acétonitrile/KH ₂ PO ₄ /Méthanol, 15:30:45; v/v/v) tels que 1, 2, 3 : 1 ^{ère} , 2 ^{ème} ou 3 ^{ème} injection.....	47

Figure 21	: Chromatogrammes obtenus lors du dosage en CLHP des échantillons à comparer. A: Ech 1; B: Ech 2; C: Ech 3; D: Ech 4; E: Ech 5; F: Ech 6	50
-----------	--	----

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 : Table RMN ^1H
- Annexe 2 : Table RMN ^{13}C
- Annexe 3 : Groupe Générique AMLODIPINE (BESILATE DE)
- Annexe 4 : Récapitulatif des temps de rétention lors de l'analyse des échantillons extraits d'AMLOR[®] et AMLOPRES[®] en CLHP
- Annexe 5 : Aspects de quelques chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des échantillons en CLHP
- Annexe 6 : Résultats du dosage en PA des échantillons extraits d'AMLOR[®] et AMLOPRES[®] en CLHP
- Annexe 7 : Attestation du Laboratoire International Associé Antananarivo-Lyon1 (LIA) Ampasapito

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

AGMED	: Agence du Médicament de Madagascar
AMM	: Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	: Agence Nationale de la Sécurité des Médicaments
ASC	: Aire Sous la Courbe
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CD ₃ OD	: Méthanol deutéré
CLHP	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
C _{max}	: Concentration Maximale en principe actif après son administration
cm	: Centimètre
CMLV	: Cellules musculaires lisses vasculaires
Da	: Dalton
DCI	: Dénomination Commune Internationale
DCM	: Dichlorométhane
°C	: Degré Celcius
ESI	: Electrospray ionisation
g	: Gramme
IMRA	: Institut Malgache des Recherches Appliquées
K	: Coefficient de réponse
kg	: Kilogramme
KH ₂ PO ₄	: Dihydrogénophosphate de potassium
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
l	: Litre
LIA	: Laboratoire International Associé
LPA	: Laboratoire Pharmacognosie Appliquée
MeOH	: Méthanol
µl	: Microlitre
µm	: Micromètre
mg	: Milligramme
MHz	: Mégahertz

min	: Minute
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
mM	: Millimole
m/z	: Rapport masse/charge
ng	: Nanogramme
nm	: Nanomètre
NOESY	: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NH ₄ OH	: Hydroxyde d'ammonium
PA	: Principe Actif
ppm	: Partie par million
R ²	: Coefficient de corrélation
R _f	: Rapport frontal
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
RP-CLHP	: Reverse Phase - Chromatographie Liquide à Haute Performance
SM	: Spectrométrie de Masse
T _{max}	: Temps correspondant à la Concentration Maximale en principe actif après son administration
TMS	: Triméthylsilane
TR	: Temps de Rétention
UV	: Ultraviolet
v/v	: Volume par volume
v/v/v	: Volume par volume par volume
δ	: Déplacement chimique
λ	: Longueur d'onde
±	: Plus ou moins
>	: Supérieur
<	: Inférieur
%	: Pourcentage

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies cardio-vasculaires constituent la première cause de mortalité dans le monde. En effet, avec un nombre de décès atteignant les 17,5 millions par an, elles représentent 30% de la mortalité mondiale [1, 2], un fait expliquant leur importance en matière de santé publique. Ne faisant pas exception à cela, Madagascar y trouve aussi un fléau pour sa population, avec un taux de prévalence de ces maladies atteignant les 39% en 2014 [3].

La recherche pour la couverture universelle en santé, l'essor des médicaments génériques ou encore l'octroi du droit de substitution au pharmacien entrent dans la contribution pour l'amélioration de la prise en charge médicamenteuse de ces maladies. En effet, les problèmes d'accès aux soins dont ceux en matière de coût, ou encore les ruptures de stock en médicaments peuvent être évités, notamment par la substitution par les médicaments génériques.

Cependant, les données portant sur le marché de ce type de médicaments, en particulier dans les pays en voie de développement, incitent d'une part au chaos de l'opinion publique; et d'autre part à la remise en cause de la qualité de la prise en charge par nous autres professionnels de la santé [4-8]. De plus, le défaut ou le coût des matériels et réactifs de laboratoire appropriés constituent un frein pour ceux qui désirent apporter des éléments de réponse à ces questionnements concernant la qualité de ces copies de médicaments. C'est le cas de l'amlodipine, un médicament antihypertenseur couramment prescrit pour les patients Malagasy. Sa substance de référence, indispensable pour son contrôle qualité, n'est pas disponible dans le pays.

La question se pose alors : la comparaison d'AMLOR[®] à ses génériques est-elle possible, en absence du produit de référence dans notre pays?

Notre objectif principal est de comparer la qualité chimique d'AMLOR[®] et AMLOPRES[®], une première étape de l'étude de bioéquivalence entre les médicaments génériques à base d'amlodipine par rapport à AMLOR[®]. Pour l'atteindre, il faut préparer la substance de référence, vérifier sa pureté et l'identifier chimiquement, et

mettre au point une méthode de dosage de cette substance. Ces quatre étapes constituent nos objectifs spécifiques.

Cet ouvrage présente trois grandes parties.

- Quelques rappels sur les médicaments génériques, sur le droit de substitution, sur les méthodes chimiques d'analyse et sur l'amlodipine seront exposés dans la première partie.
- Les méthodologies utilisées lors de nos expérimentations et les résultats obtenus seront détaillés dans la deuxième partie.
- Ces résultats seront discutés dans la troisième partie. Nous émettons également quelques recommandations par rapport à nos résultats dans ce chapitre.

PREMIERE PARTIE : RAPPELS

I. MÉDICAMENT GÉNÉRIQUE

1. Définition

On entend par médicament générique, ou copie du médicament de référence, tout médicament préparé à l'avance, dont le ou les principes actifs ne sont plus ou ne sont protégés par un brevet. De plus, sa bioéquivalence a été démontrée par des études de biodisponibilité appropriées [9, 10]. L'expiration du brevet du médicament princeps, permettant la production de ses génériques, est présentée dans la *Figure 1*.

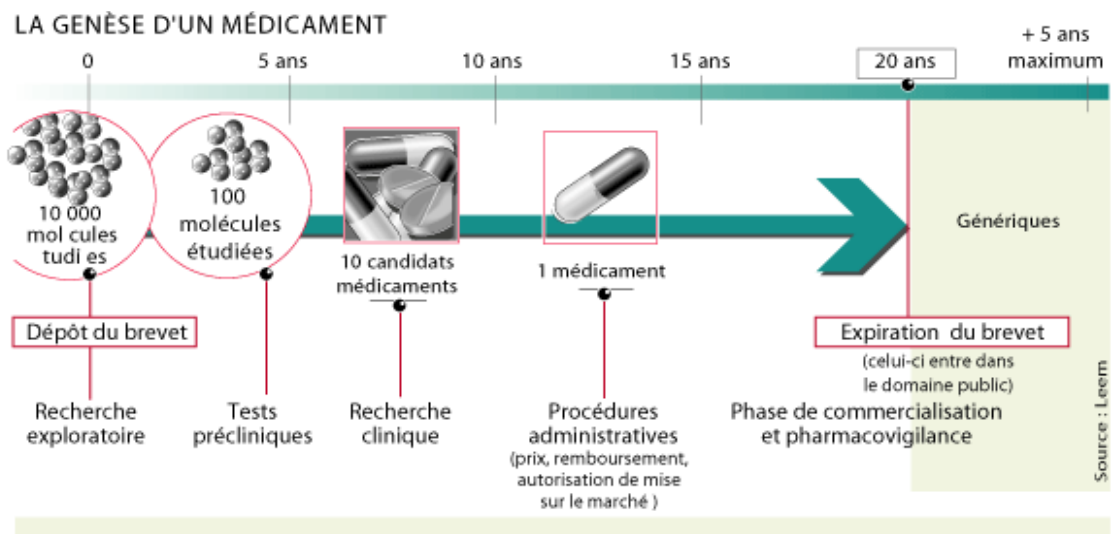


Figure 1 : Cycle administratif de vie d'un médicament

Source : Les Entreprises du Médicament. Cycle d'un médicament. LEEM, 2013.

Consultable à l'URL: <http://www.leem.org/node/53770>. [Consulté le 01/09/2014]. [11]

2. Types

Selon leur formulation, on distingue trois types de médicaments génériques [12] :

- La **copie-copie**, auto-générique ou encore générique intégral est la copie conforme du médicament original: même principe actif, même quantité, même forme galénique et mêmes excipients.
- Le **médicament similaire** présente exactement la même composition que le médicament de spécialité à la différence des excipients.

- Le **médicament assimilable** ou équivalent par contre, diffère du princeps soit par sa forme galénique, soit par la forme chimique du principe actif (différents sels).

Ces génériques doivent dans tous les cas prouver leur bioéquivalence avec le princeps.

D'autre part, il existe d'autres types de préparations qui se distinguent des médicaments génériques. Le « **me-too** » est un médicament complètement différent du médicament de référence mais ayant la même indication [13]. Le générique est à différencier du **médicament en co-marketing**, cas où une même molécule dont le brevet n'a pas encore expiré, est commercialisée en même temps par deux laboratoires différents sous des dénominations différentes [14].

Enfin, ce terme ne désigne pas un **médicament de contrefaçon** qui est plutôt une copie non autorisée [5, 6].

3. Dénominations

Le médicament générique se reconnaît par sa dénomination. Il peut s'agir de la dénomination commune internationale (DCI) de la molécule suivie du nom du laboratoire génériqueur, d'un nom de fantaisie suivie du suffixe "Gé", ou encore d'un nom de fantaisie pour le générique dit de marque [9].

4. Essor des médicaments génériques

La vente des médicaments génériques a connu une croissance constante dans le marché mondial. Elle a été accélérée par l'octroi du droit de substitution au pharmacien au début des années 2000, et a été fortement diminuée en 2011 face à la concurrence des génériques de marque et les actions des laboratoires titulaires des princeps [15]. Cette évolution est illustrée par la *Figure 2*.

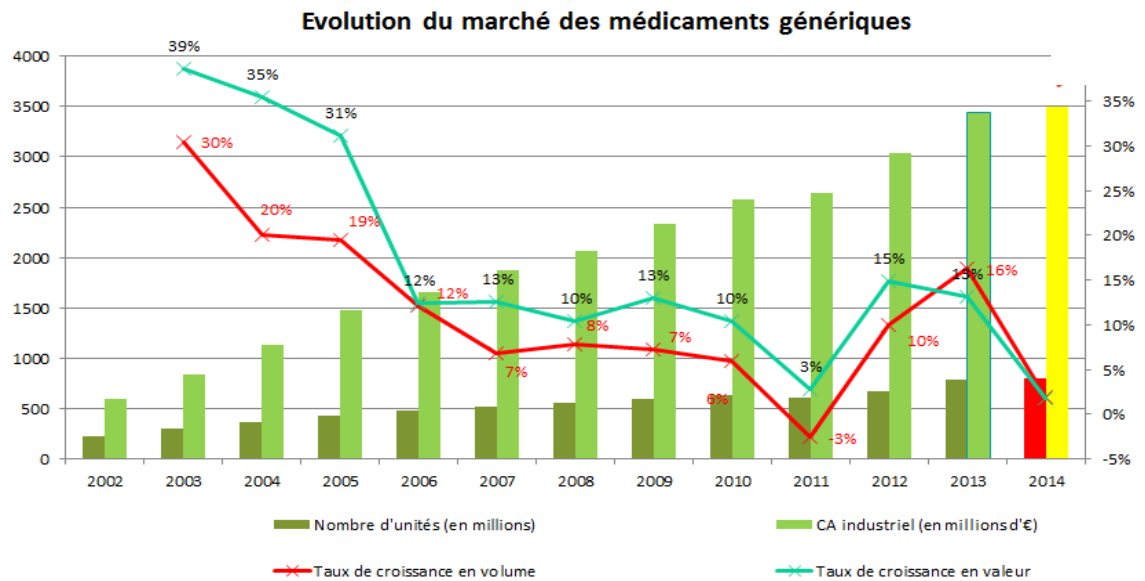


Figure 2 : Evolution du marché des médicaments génériques

Source : Association des professionnels du médicament générique – GEMME. Evolution du marché des médicaments génériques. GEMME, 2015. Consultable à l'URL: <http://www.medicamentsgeneriques.info/le-medicament-generique/chiffres-cles/>. [Consulté le 11/02/2015][16]

II. DROIT DE SUBSTITUTION

1. Définition

La substitution est l'acte par lequel le pharmacien peut délivrer un autre médicament que celui qui a été prescrit par le médecin. Elle peut se faire sur demande du patient ou sur proposition du pharmacien [17].

Toutefois, ce droit nécessite le consentement préalable du patient, l'absence de la mention « non substituable » sur l'ordonnance, ainsi que l'appartenance du produit délivré au même groupe générique que celui qui a été prescrit. De plus, le coût du médicament choisi doit être inférieur à celui qui a été remplacé [17].

Le droit de substitution, accordé en 1999, oblige le pharmacien à indiquer sur l'ordonnance le médicament substitué et engage entièrement sa responsabilité en cas de survenue d'effets indésirables, d'où l'importance qu'il doit accorder à la composition en excipients à effet notoire dans les formulations [17].

2. Groupe générique

Un **groupe générique** constitue l'ensemble formé par un médicament de spécialité ou princeps et tous les médicaments qui en sont les génériques. Le **répertoire des médicaments génériques** est constitué de tous les groupes génériques [18].

Tous les médicaments inscrits dans ce répertoire, devant être titulaires d'une Autorisation de mise sur le Marché (AMM) et ayant subi des études de bioéquivalence, sont approuvés par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) qui prend les décisions d'inscription ou de modifications dans cette liste. La première publication de ce répertoire a été en 1998. Aujourd'hui, il compte plus de 7800 médicaments génériques pour près de 1100 spécialités de référence [18].

L'organisme équivalent à l'ANSM française dans notre pays est l'Agence du Médicament de Madagascar (AGMED), structure au niveau du Ministère de la Santé, siégeant à Tsaralalàna. Il a pour mission d'assurer la qualité des médicaments sur le marché national [19], et n'a pas encore publié à ce jour le répertoire de médicaments génériques.

III. BIOEQUIVALENCE

1. Définition

La bioéquivalence entre deux médicaments relève d'une propriété pharmacologique de ceux-ci qui est la biodisponibilité. La biodisponibilité est la mesure de la quantité du principe actif qui atteint la circulation sanguine, ainsi que celle de la vitesse à laquelle il a été absorbé [20]. Elle est définie par les paramètres pharmacocinétiques suivants: la concentration maximale en principe actif après administration (C_{max}), accompagnée du temps correspondant à cette concentration (T_{max}), et l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps (ASC). Ainsi, deux médicaments sont dits bio-équivalents s'il y a similarité de ces paramètres cités suite à leur administration à une même dose et par une même voie d'administration [20].

2. Etude de bioéquivalence

Une étude de bioéquivalence est sollicitée dans différentes situations possibles. Il peut s'agir de la composition d'un dossier biopharmaceutique d'un médicament en vue d'une demande de son Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) [21], ou encore lors d'élaboration de travail de recherche scientifique.

Elle consiste en la comparaison des profils pharmacocinétiques du médicament de référence et du médicament à analyser après administration à jeun de la même dose par la même voie d'administration de ces derniers chez des sujets volontaires sains, les administrations étant espacées d'un temps équivalent à 5 demi-vies ($t_{1/2}$) de la molécule concernée au minimum [17, 22].

Pour ce faire, des prélèvements sanguins sont effectués à différents temps à partir de l'ingestion du médicament (t_0). Ils sont ensuite sujets à divers traitements physico-chimiques afin de séparer le plasma du culot cellulaire, d'en extraire le principe actif et de déterminer, par la méthode chromatographique, la concentration correspondant en principe actif dans le plasma à chaque temps respectif. Ces dosages obtenus vont alors servir à la construction de la courbe des concentrations plasmatiques du principe actif en fonction du temps, de laquelle seront déterminés $C_{\max}$, $T_{\max}$, et ASC [17, 22].

Une analyse statistique concernant la comparaison des variances termine cette étude. Les deux formulations sont considérées comme bio-équivalentes si les intervalles de confiance à 90% des moyennes de $C_{\max}$ et ASC sont compris dans l'intervalle [80%-125%] ; à l'exception des médicaments à marge thérapeutique étroite où cet intervalle est resserré à [90,00%-111,11%] [15, 17, 22].

3. Détermination des concentrations plasmatiques

Le calcul des concentrations plasmatiques en principe actif, base de la démonstration de la bioéquivalence, nécessite un dosage dit par étalonnage. Cette technique consiste à réaliser une série de mesures de grandeur physique (ASC du pic correspondant à l'analyte par exemple pour la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)) pour des solutions de concentrations connues afin de tracer la courbe d'évolution de cette grandeur en fonction de la concentration. Cette courbe

d'étalonnage, appelée aussi courbe de référence, permet ensuite de retrouver la concentration inconnue de la solution à doser à partir de la mesure de la grandeur physique choisie [23].

Pour ce faire, une solution standard est requise pour établir cette courbe étalon. Deux cas sont possibles, soit la solution est préparée à partir d'une substance de référence importée ou approvisionnée au sein de structures spécialisées (telles que l'AGMED) ; soit la molécule pure est obtenue d'une extraction à partir de préparations pharmaceutiques commercialisées dans le pays.

D'autre part, bien que plusieurs méthodes analytiques soient possibles pour le dosage du principe actif (spectroscopie, chromatographie...), leur choix doit se porter sur deux critères: spécificité de la méthode par rapport à la nature chimique du produit, et bonne séparation du produit [24]. Dans le cas de la CLHP, le choix de la composition du système éluant est primordial pour l'identification du produit à analyser.

IV. METHODES D'ANALYSE

1. Techniques chromatographiques

La chromatographie est une méthode physico-chimique permettant de séparer un mélange en ses différents constituants. Cette séparation est basée sur la différence d'affinité de ces composés constitutifs, compte tenu de leurs propriétés physico-chimiques respectives, vis-à-vis des deux phases de la chromatographie [24]. En effet, cette technique met en jeu une phase mobile qui sert à entraîner l'échantillon à travers une autre phase dite stationnaire. Les polarités de ces deux phases étant différentes, la rétention des composants de l'échantillon sera plus importante au niveau de l'une ou de l'autre. Ainsi, la distance de migration des substances sera différente, entraînant leur séparation à travers la phase stationnaire [24].

Il existe différents types de chromatographie, parmi lesquels figurent la chromatographie sur couche mince, la chromatographie liquide et la chromatographie en phase gazeuse.

1.1. Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Elle dérive de la chromatographie liquide sur colonne. Les phases stationnaires formées de micro-particules (alumine, silice greffée ou non), génèrent des colonnes garnies très compactes qui imposent en tête de colonne, de fortes pressions pour assurer un écoulement suffisant de la phase mobile. Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire et vice-versa. La chromatographie est dite *en phase normale* dans le premier cas et à *polarité de phase inversée* (« RP-CLHP ») dans le second. Les constituants du mélange sont identifiables grâce à leur temps de rétention sur le chromatogramme dans des conditions chromatographiques bien définies [24, 25].

1.2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La Chromatographie sur Couche Mince est une technique complémentaire de la CLHP, ayant sa propre efficacité. Il s'agit d'une méthode chromatographique qualitative et semi-quantitative dont la phase stationnaire est qualifiée de plane, la plaque CCM. La phase mobile se déplace par capillarité. Au terme du phénomène d'élution, le rapport frontal (R_f) de chaque constituant peut être déterminé. Il correspond à sa migration relative par rapport au solvant.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

Il est caractéristique d'une substance dans des conditions chromatographiques définies [24, 25].

La réalisation d'une analyse sur CCM est schématisée sur la *Figure 3*.

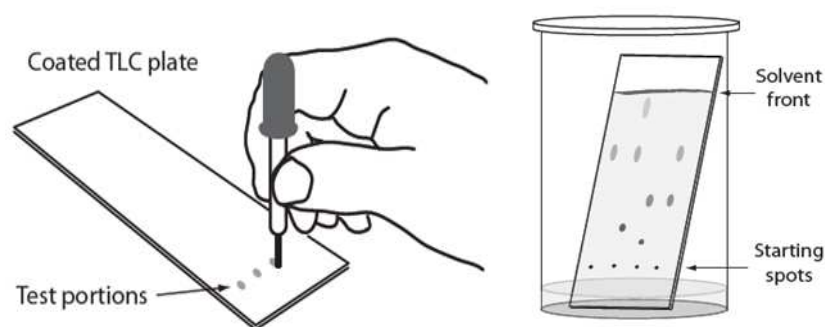


Figure 3: Schéma d'une CCM

Source: Tissue BM. Analytical separations. Basics of Analytical Chemistry and Chemical Equilibria. 2013;10:307-406. [24]

2. Spectrométrie de masse (SM), source ESI

Cette technique d'analyse physique permet d'identifier un composé en déterminant sa masse moléculaire [24].

Un électrospray ou nébulisation électrostatique est produit en appliquant un fort champ électrique, à pression atmosphérique, à un liquide passant à travers un tube capillaire (75 μm) avec un faible débit (100 à 3000 ml/min). Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, située à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées. [26]

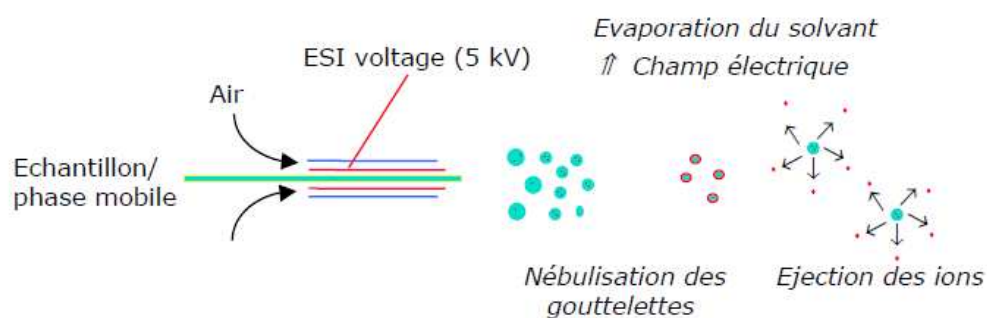


Figure 4 : Principe de l'ionisation par électrospray

L'excès de charges électriques dans chaque gouttelette, combiné à l'évaporation progressive des solvants conduit à un point où les répulsions coulombiennes excèdent les forces de cohésion des gouttelettes. Ce phénomène induit une cascade d'explosions

coulombiennes au cours de laquelle des microgouttelettes sont formées, permettant ainsi la désorption de molécules multichargées. [26]

Ce mode d'ionisation a pour particularités de former des ions pseudo-moléculaires polychargés qui peuvent être obtenus de plusieurs façons:

- En **mode positif**, protonation d'un site basique : les ions sont souvent du type $[M+nH]^{n+}$ où les charges sont données par les protons. Des ions de cationisation (ou adduits) sont également observés.
- En **mode négatif**, déprotonation: la formation d'espèces ionisées $[M-nH]^{n-}$ s'obtient par déprotonation, anionisation ou perte de contre-cation. [26]

ESI est une ionisation douce qui donne peu de fragmentation.

3. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN est une méthode d'analyse permettant d'identifier la structure chimique d'une molécule. Elle consiste en la détection de certains noyaux atomiques ayant des propriétés magnétiques, c'est-à-dire dont le spin nucléaire est différent de 0. Il peut concerner le carbone-13 (^{13}C), l'oxygène-17 (^{17}O), le fluor-19 (^{19}F), mais le plus couramment utilisé est le proton (^1H) [24, 25].

La RMN tire des informations de l'interaction qui peut apparaître entre les noyaux des atomes présents dans l'échantillon quand on le soumet à un champ magnétique intense et constant, produit par un aimant de spectre RMN, qui résulte de l'absorption par l'échantillon de certaines fréquences envoyées par la source électromagnétique (*Figure 5*). L'interprétation des signaux (position, aspect, intensité) conduit à un ensemble de renseignements sur l'échantillon.

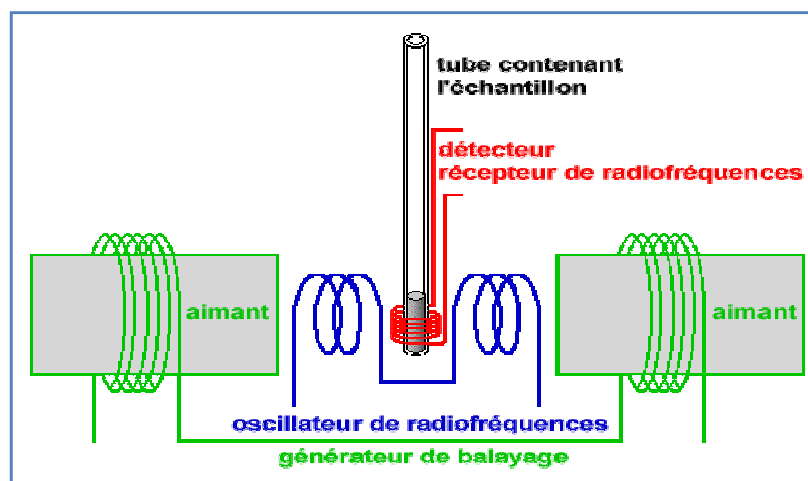


Figure 5: Principe de fonctionnement d'un appareil RMN

La résonance dépend de l'environnement de chacun de ces noyaux (nature des atomes et des liaisons adjacents au ^1H). Plus le noyau est blindé, plus le proton doit être soumis à un champ fort pour que la résonance se produise. Ceci se traduit par un déplacement de ses pics d'absorption vers la droite du tracé du spectre, donc un déplacement chimique (δ) exprimé en partie par million (ppm) faible. Inversement, un déblindage entraîne une diminution de la valeur du champ nécessaire à la résonance et donc un déplacement chimique plus élevé [24, 25]. Ce principe est schématisé sur la Figure 6.

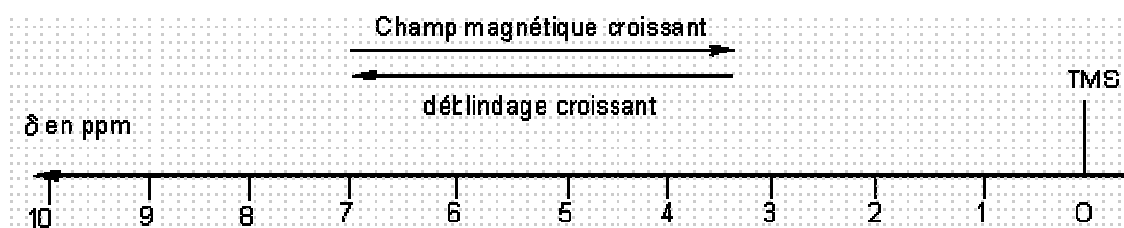


Figure 6 : Principe du déplacement chimique dans un spectre RMN

Le déplacement chimique est repéré par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

Pour le proton, δ varie de 0 à 15 ppm. Ainsi, grâce à une table de RMN du proton (présentée dans l'Annexe 1), le spectre obtenu permet de déterminer le nombre de protons et de connaître différents fragments de la structure de la molécule analysée.

Tout comme la spectroscopie RMN du ^1H , celle du ^{13}C se base sur la détection du phénomène de RMN mais avec comme atome cible le ^{13}C , son spin à l'état fondamental étant égal à $\frac{1}{2}$ à la différence de celui du ^{12}C qui est nul. En RMN ^{13}C , il se produit souvent des chevauchements de signaux qui rendent le spectre moins lisible.

Dans un spectre RMN ^{13}C Broadband decoupling, les signaux sont totalement découplés des protons, aussi le spectre ne présente que des singulets. Chaque pic correspond à un couplage carbone-carbone. S'il n'y a pas de recouvrement de carbone sur ce spectre, ce dernier donne le nombre de carbone dans la molécule.

L'examen du spectre permet de reconnaître le noyau qui ne porte pas de protons par la faible intensité de son pic.

Une table présentant les différents déplacements chimiques par rapport à l'environnement de l'atome, spécifique du ^{13}C (*Annexe 2*) est aussi nécessaire pour l'interprétation du spectre obtenu afin d'établir le squelette de la molécule étudiée. Les déplacements des résonances ^{13}C dans les molécules organiques couvrent un domaine de 250 ppm environ.

V. AMLODIPINE

1. Structure chimique

L'amlodipine appartient à la famille chimique des dihydropyridines [27]. Sa formule brute est $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_5$ et sa dénomination chimique est (*RS*)-2-(2-aminoéthoxyméthyl)-4-(2-chlorophényl)-6-méthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de 3-O-éthyle et 5-O-méthyle. Son poids moléculaire en tant que base est 408,9 g/mol [28]. Sa formule chimique développée est présentée sur la *Figure 7*.

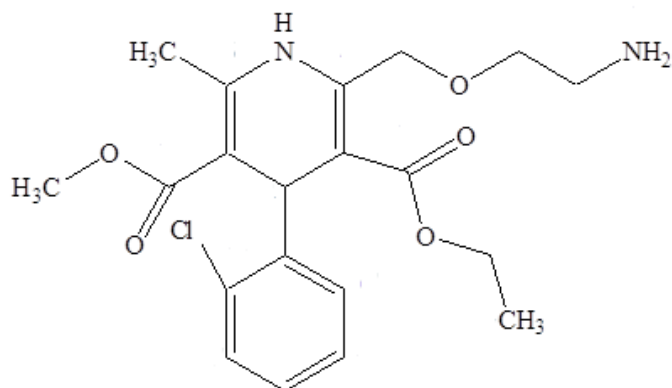


Figure 7 : Formule développée de l'amlodipine base

Source : Pharmacopée Européenne. Monographies A, 6^{ème} édition. Phar Eur. 2008;6(2);1271-3. [28]

L'amlodipine possède deux énantiomères (*R*) et (*S*). Dans les formulations pharmaceutiques, il peut être présent sous forme de sels : le maléate ou plus fréquemment le benzènesulfonate appelé aussibésilate [28].

2. Propriétés physico-chimiques

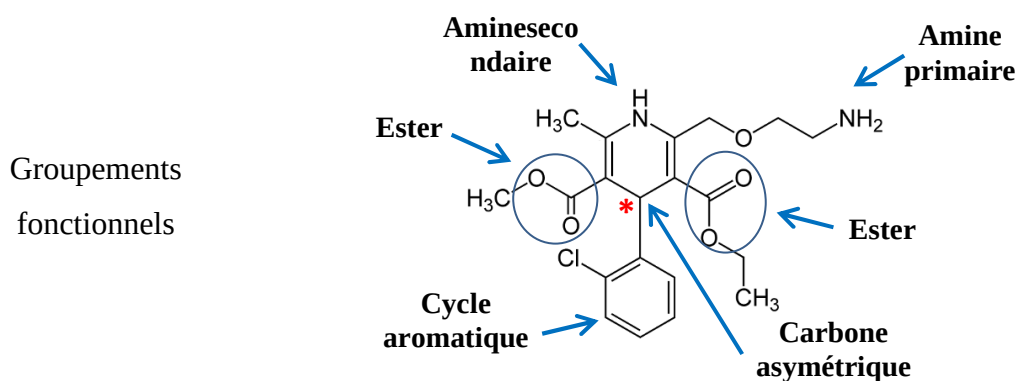
Les propriétés physico-chimiques de l'amlodipine sont portées dans le *Tableau I*.

Elles nous donnent les informations sur les caractères acido-basiques de notre molécule, ainsi que les possibilités d'interactions qu'elle peut avoir (notamment avec ses récepteurs). Ces renseignements nous sont aussi utiles pour le choix du système d'éluants donnant une bonne séparation, mais aussi pour le choix sa méthode d'extraction.

La présence des amines confère à l'amlodipine un caractère basique grâce à la présence du doublet non-liant de l'azote. Ceci permet une possibilité d'extraction en milieu aqueux en présence d'acide fort. De plus, les amines peuvent réagir en formant des liaisons hydrogènes.

Tableau I : Propriétés physico-chimiques de l'amlodipine

Aspect	Poudre blanche ou sensiblement blanche	
Solubilité	Eau	Peu soluble
	Méthanol	Facilement soluble
	Ethanol	Assez soluble
	2-Propanolol	Peu soluble
pKa	9,45	



Source : Pharmacopée Européenne. Monographies A, 6^{ème} édition. Phar Eur. 2008;6(2);1271-3. [28]

D'une part, le cycle aromatique, composé de doubles liaisons conjuguées, donnent lieu à des liaisons π - π (interactions de Van der Waals). C'est un groupement hydrophobe. D'autre part, ce cycle constitue un pharmacophore, permettant la détection de la molécule dans l'UV-visible [25].

Les groupements esters peuvent être sujets à des substitutions nucléophiles telles que l'alcoolyse ou l'ammonolyse.

La présence d'un carbone asymétrique se traduit par un pouvoir rotatoire de la molécule.

3. Mécanisme d'action pharmacologique

L'amlodipine, étant une dihydropyridine, appartient à la classe pharmacothérapeutique des inhibiteurs calciques vaso-sélectifs. De ce fait, il bloque les canaux calciques voltage-dépendants lents de type L des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) dans leur conformation inactive (*Figure 8*), empêchant ainsi le passage transmembranaire des ions Ca^{++} dans le cytoplasme. Une cascade de réactions Ca^{++} -dépendantes (*Figure 9*) est alors empêchée.

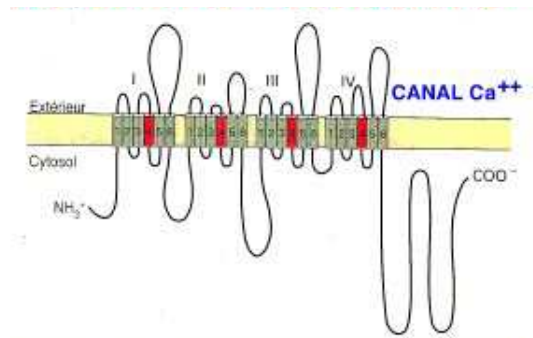


Figure 8 : Schéma d'un canal calcique voltage-dépendant lent de type L

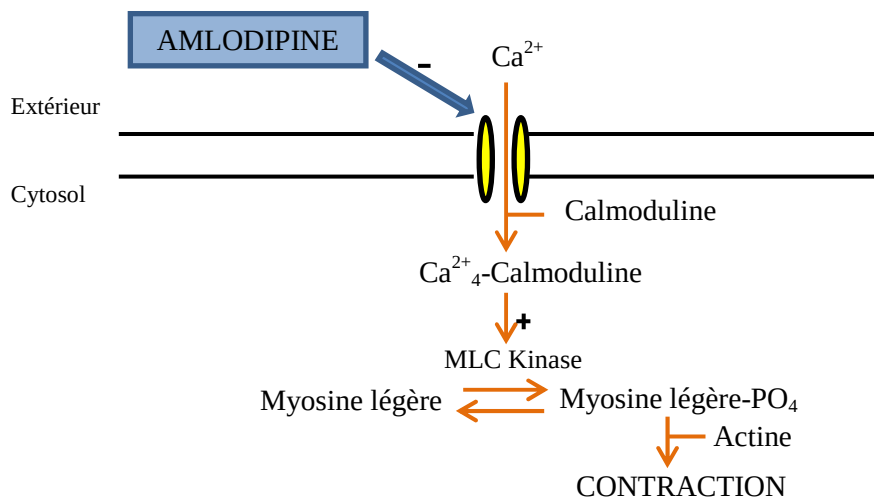


Figure 9 : Contraction cellulaire et mécanisme d'action de l'amlodipine au niveau des CMLV

4. Effets thérapeutiques

D'une part, son mode d'action conduit à une relaxation au niveau des vaisseaux sanguins, responsable de l'effet antihypertenseur, sans parler des effets diurétiques et

natriurétiques de la molécule. Son mode d'action progressif permet d'éviter la survenue d'une hypotension [27, 29, 30].

D'autre part, cette diminution de l'influx calcique conduit à une dilatation des artérioles périphériques, d'où la réduction de la consommation d'énergie par le cœur ainsi que ses besoins en oxygène, suite à la diminution de la résistance périphérique totale. De plus, la dilatation au niveau des artères et artérioles coronaires augmente l'apport en oxygène au muscle myocardique [27, 29, 30].

Ces propriétés justifient ainsi l'indication de la molécule dans les traitements de l'hypertension artérielle et des crises d'angor dont l'angor de Prinzmetal. Elle peut, en outre, être associée à d'autres médicaments tels que les diurétiques, les bêtabloquants ou encore les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine pour augmenter son effet antihypertenseur [27, 29, 30].

5. Propriétés pharmacocinétiques

Après administration par voie orale, 64 à 80% de la dose d'amlodipine ingérée arrive au niveau de la circulation générale, où elle atteint sa concentration maximale au bout de 6 à 12 heures. Sa biodisponibilité n'est pas affectée par la prise d'aliments. Son volume de distribution est de 21 L/kg. Son taux de fixation aux protéines plasmatiques est estimé à 97,5% [29, 30].

L'amlodipine est ensuite principalement métabolisée par le foie en métabolites inactifs. Sa demi-vie d'élimination varie entre 35 et 50 heures, ce qui justifie une prise unique journalière par le patient. Cette élimination rénale concerne 10 % de la molécule mère et 60 % de métabolites [29, 30].

En cas d'insuffisance hépatique, la demi-vie de la molécule est plus longue et la surface sous la courbe augmente de 40 à 60%. Ceci a pour conséquence une diminution de sa clairance. Il en est de même chez le sujet âgé et chez les personnes atteintes d'insuffisance cardiaque congestive [29].

6. Médicaments à base d'amlodipine enregistrés à Madagascar

Parmi la liste des médicaments enregistrés au sein de l'AGMED, ceux à base d'amlodipine y figurent en nombre important. Certains contiennent uniquement de

l'amlodipine comme principe actif, tandis que d'autres sont en association fixe avec d'autres molécules antihypertensives ou encore diurétiques [31]. Leurs listes sont portées respectivement dans les *Tableaux II* et *III*.

Nous retrouvons AMLOR[®], correspondant au médicament de spécialité, ainsi que ses nombreux génériques provenant en majorité de laboratoires implantés en Inde, développés depuis l'expiration en 2007 de son brevet détenu jusque-là par PFIZER.

Tableau II : Liste des médicaments à base d'amlodipine enregistrés à l'AGMED

Nom commercial	Présentation	Principe actif	Laboratoire
AMLOR [®] 10MG	Gélule, Boîte de 30	Amlodipine	PFIZER, France
AMLOR [®] 5MG	Gélule, Boîte de 30	Amlodipine	
AMLODIPINE CRISTERS [®] 10MG	Gélule, Boîte de 30	Amlodipine	CRISTERS, France
AMLODIPINE CRISTERS [®] 5MG	Gélule, Boîte de 30	Amlodipine	
AMLODIPINE PFIZER [®] 10MG	Gélule, Boîte de 90	Amlodipine	PFIZER, France
AMLODIPINE PFIZER [®] 10MG	Gélule, Boîte de 30	Amlodipine	
AMLIBON [®] 10MG SANDOZ	Comprimé, Boîte de 30	Amlodipine	SANDOZ GMBH, Autriche
AMLIBON [®] 10MG SANDOZ	Comprimé, Boîte de 30	Amlodipine	
AMLO-DENK [®] 10MG	Comprimé, Boîte de 50	Amlodipine	DENK PHARMA, Allemagne
AMLO-DENK [®] 5MG	Comprimé, Boîte de 50	Amlodipine	
AMADAY [®] 10MG	Comprimé, Boîte de 30	Amlodipine	AJANTA PHARMA LTD, Inde

AMADAY [®] 5MG	Comprimé, Boîte de 30	Amlodipine	
AMLOPRES [®] 5MG	Comprimé, Boîte de 10 ou 100	Amlodipine	CIPLA LTD, Inde
ADIPIN [®] 10MG	Comprimé, Boîte de 10 ou 100	Amlodipine	GLOBAL PHARMA HEALTH CARE
APIDIN [®] 5MG	Comprimé, Boîte de 10 ou 100	Amlodipine	PVT LTD, Inde
AMLIN [®] 10MG	Comprimé, Boîte de 30	Amlodipine	LINCOLN PHARMACEUTICAL
AMLIN [®] 5MG	Comprimé, Boîte de 30	Amlodipine	LTD, Inde
AMLONG [®] 10MG	Comprimé, Boîte de 30	Amlodipine	MICROLABS LTD, Inde
AMLONG [®] 5MG	Comprimé, Boîte de 30	Amlodipine	
AMLODIP [®] 10MG	Comprimé, Boîte de 100	Amlodipine	NABROS PHARMA
AMLODIP [®] 5MG	Comprimé, Boîte de 100	Amlodipine	PVT LTD, Inde
AMEDIN [®] 10MG MEDREICH	Comprimé, Boîte de 28 ou 100	Amlodipine	SANOFI WINTHROP INDUSTRIE
AMEDIN [®] 5MG MEDREICH	Comprimé, Boîte de 28 ou 100	Amlodipine	(SWIND), Inde

Source : Agence du médicament de Madagascar. Liste des médicaments enregistrés à Madagascar par titulaires d'AMM. AGMED, 2014, 35 p. Consultable à l'URL:http://www.agmed.mg/Pdf/Liste_AMM_2014.pdf. [Consulté le 01/09/2014][31]

Tableau III : Liste des médicaments à base d'amlodipine en association fixe enregistrés à l'AGMED

Nom commercial	Présentation	Principe actif	Laboratoire
COVERAM [®] 10MG/10MG	Comprimé Boîte de 30	Perindopril arginine 10mg/ Amlodipine 10mg	
COVERAM [®] 10MG/5MG	Comprimé, Boîte de 30	Perindopril arginine 10mg/ Amlodipine 5mg	SERVIER, France
COVERAM [®] 5MG/10MG	Comprimé, Boîte de 30	Perindopril arginine 5mg/ Amlodipine 10mg	
COVERAM [®] 5MG/5MG	Comprimé, Boîte de 30	Perindopril arginine 5mg/ Amlodipine 5mg	
APROVASC [®] 150MG/10MG	Comprimé, Boîte de 10 ou 100	Irbesartan 150mg/ Amlodipine 10mg	
APROVASC [®] 150MG/5MG	Comprimé, Boîte de 14	Irbesartan 150mg/ Amlodipine 5mg	SANOFI AVENTIS, MEXICO S.A, Mexique
APROVASC [®] 300MG/10MG	Comprimé, Boîte de 14	Irbesartan 300mg/ Amlodipine 10mg	
APROVASC [®] 300MG/5MG	Comprimé, Boîte de 14	Irbesartan 300mg/ Amlodipine 5mg	
APROVASC [®] 150MG/10MG	Comprimé, Boîte de 14	Irbesartan 150mg/ Amlodipine 10mg	
EXFORGE [®] 10MG/160MG	Comprimé, Boîte de 28	Amlodipine 10mg/ Valsartan 160mg	
EXFORGE [®] 5MG/160MG	Comprimé, Boîte de 28	Amlodipine 5mg/ Valsartan 160mg	NOVARTIS PHARMA AG, Suisse
EXFORGE [®] 5MG/80MG	Comprimé, Boîte de 28	Amlodipine 5mg/ Valsartan 80mg	
EXFORGE HCT [®] 10MG/160MG/12,5MG	Comprimé, Boîte de 28	Amlodipine 10mg/ Valsartan 160mg/ Hydrochlorothiazide 12,5mg	

EXFORGE HCT [®] 10MG/160MG/25MG	Comprimé, Boîte de 28	Amlodipine 10mg/ Valsartan 160mg/ Hydrochlorothiazide 25mg	
EXFORGE HCT [®] 5MG/160MG/12,5MG	Comprimé, Boîte de 28	Amlodipine 5mg/ Valsartan 160mg/ Hydrochlorothiazide 12,5mg	
EXFORGE HCT [®] 5MG/160MG/25MG	Comprimé, Boîte de 28	Amlodipine 5mg/ Valsartan 160mg/ Hydrochlorothiazide 25mg	
AMLOZAAR [®] 50MG/5MG	Comprimé, Boîte de 30	Losartan 50mg/ Amlodipine 5mg	MICRO LABS LTD, Inde

Source : Agence du médicament de Madagascar. Liste des médicaments enregistrés à Madagascar par titulaires d'AMM. AGMED, 2014, 35 p. Consultable à l'URL:http://www.agmed.mg/Pdf/Liste_AMM_2014.pdf. [Consulté le 01/09/2014][31]

DEUXIEME PARTIE :
METHODES ET RESULTATS

I.METHODES

Les expériences ayant fait l'objet de ces travaux ont été:

- la mise au point de la méthode d'extraction de l'amlodipine, réalisée au sein du Laboratoire de Pharmacognosie Appliquée de l'Institut Malagasy de Recherches Appliquées (IMRA), Fondation Albert et Suzanne RAKOTO-RATSIMAMANGA ;
- l'identification de l'amlodipine, la mise au point de la méthode de dosage ainsi que l'analyse en CLHP pour la comparaison chimique des médicaments, celles-ci réalisées au niveau du Laboratoire International Associé Antananarivo-Lyon1 (LIA), sis à Ampasapito, en collaboration avec la Faculté des Sciences.

1. Mise au point d'une méthode d'extraction

1.1 Protocole expérimental de l'extraction

Principe

Cette opération est menée dans le but d'obtenir un produit de référence, celui-ci n'étant pas disponible à Madagascar, pour le dosage en amlodipine des préparations pharmaceutiques en CLHP.

Elle consiste à récupérer principalement le produit actif (PA), c'est-à-dire l'amlodipine, à partir de comprimés d'AMLO DENK[®] 5 mg, un médicament générique européen. La méthode adoptée pour ce travail est une méthode basée sur l'extraction des alcaloïdes, mais expérimentée au cours de cette étude pour celle de l'amlodipine.

Matériels

Pour mener à bien l'extraction, divers verreries, matériels de laboratoire et réactifs sont utilisés durant ces travaux. La liste est donnée dans le *Tableau IV*.

Tableau IV : Liste des matériels utilisés pour l'extraction

Verrerie	Appareils	Réactifs	Autres
- Pipettes	- Evaporateur rotatif,	-	- Mortier
Pasteur	Rotavapor R-114,	Ammoniaque, Prolabo	- Pilon en
- Béchers	Büchi	- Acide acétique	porcelaine
-	- Pompe à vide,	100%, Prolabo	- Poires
Pipettes graduées	VEM Motors Thurm	- Dichlorométhane,	- Pro-pipettes
- Erlenmeyers	- Balance de	Prolabo	- Papiers filtres
- Ballon à	précision,		Whatman
évaporer	Mettler AE 163		- Spatules en acier
- Ampoule à	- pH-mètre,		inoxydable
décanner	Dosatest pH 5,0-8,0		- Réducteurs
- Entonnoirs	- Réfrigérateur		- Pincés
- Tubes à essais	- Congélateur		- Portoir
- Fioles jaugées			- Parafilm
			- Coton hydrophile

Une boîte d'AMLO DENK[®] dosés à 5 mg, non périmée et achetée au niveau d'une officine privée est utilisée.

Mode opératoire

Trente-six comprimés de AMLO DENK[®] 5 mg sont broyés en fine poudre à l'aide d'un pilon dans un mortier en porcelaine. Le broyat homogène obtenu est ensuite mouillé avec quelques gouttes de NH₄OH prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur, pour rendre le PA sous forme de base libre. Le tout est transvasé dans un bécher, dans lequel 20 ml de DCM distillés sont ajoutés et laissé macérer pendant 5 min.

Au bout de ce temps, la solution est filtrée à l'aide d'un entonnoir en verre et d'un papier filtre Whatman pour être recueillie dans un ballon d'évaporation. Le résidu solide retenu dans le papier filtre est ensuite récupéré dans un bécher et l'opération est répétée deux fois.

Le volume de l'ensemble des filtrats recueillis dans le ballon d'évaporation est réduit à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C afin d'obtenir environ 20 ml de solution.

Par la suite, pour transformer le PA sous forme de base libre en forme sel, 20 ml d'acide acétique 100% dilué à 2% sont ajoutés à cette solution de DCM. L'ensemble est bien agité à l'aide d'une spatule en acier inoxydable avant d'être introduit dans une ampoule à décanter. Le temps de décantation est de 5 min.

La séparation des deux phases achevée, la phase organique correspondant à la phase inférieure, est récupérée dans un bécher dans lequel sont de nouveau additionnés 20 ml d'eau distillée; tandis que la phase aqueuse est versée dans une fiole à part. Ce partage liquide-liquide est répété deux fois.

La suite du protocole expérimental consiste à verser petit à petit quelques gouttes de NH_4OH prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur dans la fiole contenant les phases aqueuses réunies, jusqu'à obtenir un pH 8,0 au papier pH. Cette opération est réalisée afin de rendre le PA sous forme de base libre.

Soixante ml de DCM distillé sont ensuite ajoutés à cette solution basique. Le tout est bien mélangé à l'aide d'une spatule en acier inoxydable avant d'être transvasé dans une ampoule à décanter. Après la séparation des deux phases, la phase organique, inférieure, est recueillie dans un ballon d'évaporation alors que la phase aqueuse supérieure est récupérée dans un bécher. Ce rinçage au DCM est effectué trois fois, à raison de 60 ml de DCM pour 60 ml de solution.

Enfin, le volume de l'ensemble des phases organiques contenu dans le ballon d'évaporation est réduit à l'évaporateur rotatif à 40°C , puis transvasé dans un tube à essais préalablement pesé, avant d'être séché sous vide à l'évaporateur rotatif. Le résidu est pesé à l'aide d'une balance de précision. Après soustraction de la tare, la masse de l'extrait est notée.

Ce procédé d'extraction est résumé sur la *Figure 10*.

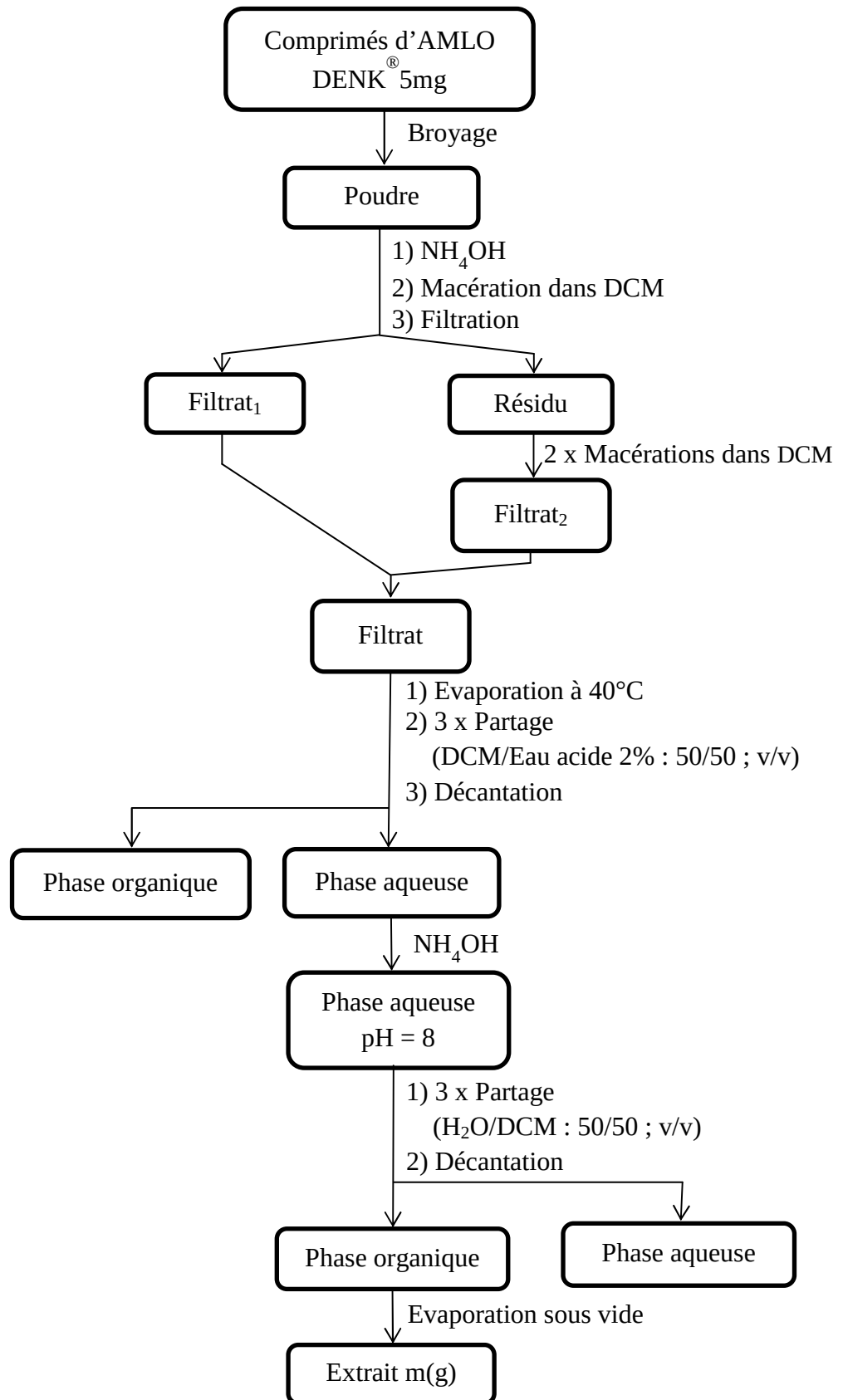


Figure 10 : Protocole d'extraction de l'amlodipine dans les comprimés d'AMLO DENK®

1.2 Identification de l'amlodipine extraite

Les analyses ayant permis de vérifier l'exactitude de notre méthode d'extraction sont la chromatographie sur couche mince (CCM), les spectroscopies de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H et du carbone-13 (^{13}C) et la spectrométrie de masse (SM). Le produit a été envoyé à l'Université Claude-Bernard Lyon1 pour la réalisation de ces trois dernières méthodes.

1.2.1- Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Objectif

Elle permet de vérifier la pureté du produit obtenu à l'issue de cette méthode d'extraction.

Une molécule pure est caractérisée par la présence d'une seule tache sur le chromatogramme quel que soit le système d'éluants utilisé.

Matériels

Cette opération a sollicité quelques matériels dont une plaque chromatographique de silice 60 F₂₅₄ sur support en feuille d'aluminium, d'épaisseur 0,2 mm (Merck), une cuve chromatographique, des tubes capillaires, un séchoir et une lampe Ultra-Violet (UV) aux longueurs d'onde 254 nm et 365 nm.

Du méthanol pur (Prolabo) et du DCM (Prolabo) acheté auprès de CHIMIDIS mais rectifié par évaporation sont utilisés pour la préparation du système d'éluant et pour dissoudre le produit à analyser.

Mode opératoire

Plusieurs systèmes d'éluants ont été essayés mais c'est le mélange DCM-Méthanol (90:10, v/v) qui a donné une bonne séparation et qui a été utilisé pour la suite du travail.

Pour saturer la cuve d'éluant, celui-ci est versé et ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve chromatographique 15 min avant l'introduction de la plaque chromatographique.

La ligne de dépôt est tracée à 1 cm du bord inférieur de la plaque CCM. L'extrait à analyser est déposé sous forme d'un trait fin dont les extrémités se situent chacune à 1 cm des bords latéraux d'une plaque CCM de largeur 3 cm. Le dépôt est ensuite rapidement séché à l'aide d'un sèche-cheveux pour éviter de faire une tache large. La plaque est introduite verticalement dans la cuve, accompagnée d'une deuxième plaque vierge, servant de témoins en cas d'impuretés déjà présentes dans le solvant. La cuve est recouverte pendant le développement.

Lorsque la position du front du solvant est à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, les plaques sont retirées de la cuve. Le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis les plaques sont séchées à l'air libre.

Les plaques sont ensuite observées sous lumière UV à 254 nm et 365 nm et le R_f est calculé.

1.2.2- Spectrométrie de masse (SM)

Objectif

L'objectif est de déterminer la masse moléculaire du composé par interprétation du spectre de fragmentation.

Matériel

Les extraits sont dissous dans du méthanol avant d'être analysés.

Le spectre de masse est obtenu grâce à un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI), ou nébulisation électrostatique, en mode positif.

Méthode

Après obtention du spectre de masse, on identifie le pic pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ pour connaître la masse moléculaire, puis on interprète les divers fragments observés.

1.2.3- Spectrométrie RMN

Objectif

Utilisée en complément de la spectrométrie de masse, la RMN a pour objectif de déterminer la formule développée de la molécule.

Matériel

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire ont été enregistrés sur un appareil BRUKER AV-500 pour la RMN ^1H et AV-100 pour la RMN ^{13}C . Toutes les valeurs des déplacements chimiques (δ , ppm) sont données par rapport au TMS pris comme référence interne.

Méthode

Après réception des spectres RMN de notre échantillon, la première étape est l'identification des spectres. Cette dernière est résumée dans le *Tableau V*.

Tableau V : Identification des spectres RMN

Identification	Type de spectre
- Un seul axe de δ tel que $0 < \delta < 15\text{ppm}$ - Présence de pics singulet et multiplet - Présence de courbe d'intégration	Spectre RMN ^1H classique monodimensionnel
- Un seul axe de δ tel que $0 < \delta < 250\text{ppm}$ - Présence uniquement de pics singulet - Absence de courbe d'intégration	Spectre RMN ^{13}C Broadband Decoupling

- Pour la RMN ^1H :

A l'aide de la courbe d'intégration, on détermine le nombre relatif de protons correspondant à chaque signal. Puis, on détermine le type de proton correspondant à chaque signal en utilisant les tables de corrélation empiriques des déplacements chimiques en fonction des structures chimiques (*Annexe 1*) d'une part, et en comparant les valeurs de δ à celles données par la littérature et le logiciel Chemdraw, d'autre part.

- Pour la RMN ^{13}C Broadband Decoupling :

On compte le nombre de pics dans le spectre et on le compare au nombre de carbone dans l'Amlodipine, puis on procède comme dans la deuxième partie de la RMN ^1H .(Annexe 2).

2. Mise au point d'une méthode de dosage en CLHP couplée au spectromètre UV-visible

Objectif

Cette opération a pour objectif de trouver une méthode de séparation de l'amlodipine en CLHP, dont les critères sont les suivants: disponibilité des solvants, moindre coût, reproductibilité, stabilité, bonne séparation (pics acceptables) et possibilité de séparation dans le plasma.

L'optimisation d'une séparation en CLHP est le compromis entre une bonne séparation et un temps d'analyse relativement court. L'optimisation dépend :

- de la colonne et de ses caractéristiques
- de la phase mobile et des paramètres liés aux réglages du chromatographe : elle consiste à moduler les paramètres suivants: la composition du système d'éluant (polarité, pH), la longueur d'onde de détection, l'atténuation du signal, la surface minimale des pics au niveau du chromatogramme et le volume d'injection.

Matériel

La séparation en CLHP a nécessité un appareil CLHP (Shimadzu) (*Figure 11*), composé de :

- une **pompe**(Shimadzu, LC-10AS) servant à faire circuler l'éluant depuis le réservoir à travers la colonne. Le débit de l'élution est défini au niveau de la pompe;
- un **injecteur** par lequel l'échantillon à analyser est introduit grâce à une micro-seringue en verre à piston métallique ;

- une **colonne** en acier inoxydable (15 cm x 4,6 mm) renfermant du gel de silice greffé à l'octadecyl C18 (Interchrom KR₅ C₁₈, Kromasil) avec une taille de particule de 5 µm ;
- un **détecteur** UV-visible (Shimadzu, SPD-6A);
- un **enregistreur** (Shimadzu, C-R6A Chromatopac) par lequel on obtient les chromatogrammes.



Figure 11 : Photo de l'appareil CLHP du LIA (cliché de l'auteur)

En outre, une balance de précision (Mettler AE163) est utilisée pour la pesée des réactifs et produits dans la préparation des solvants utilisés et un pH-mètre (Mettler) est requis pour l'ajustement du pH de la solution tampon. Le système d'éluant est filtré et dégazé à l'aide d'une pompe sous vide.

Mode opératoire

La mise au point de la méthode de dosage en CLHP est schématisée sur la *Figure 12*.

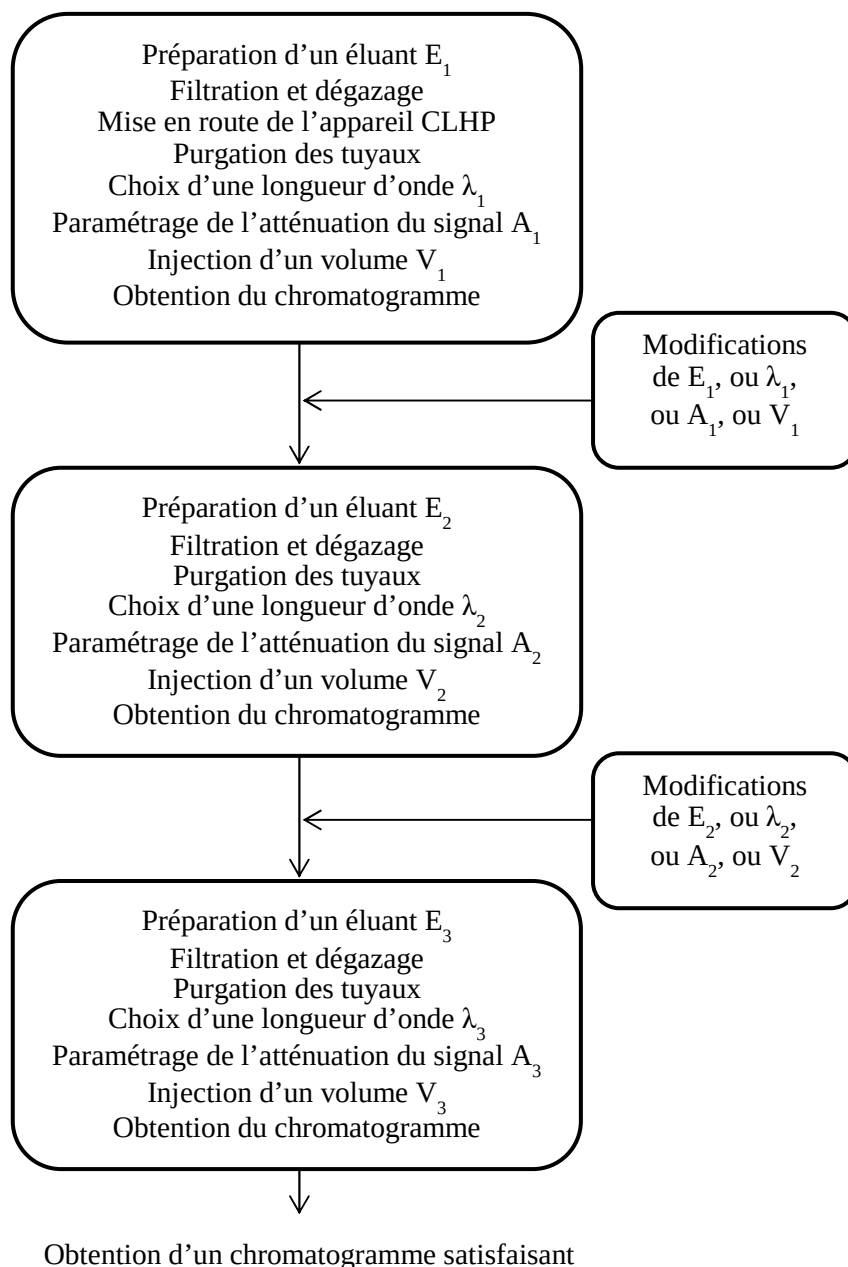


Figure 12 : Mise au point de la méthode de dosage de l'amlodipine en CLHP

La phase stationnaire étant des gels de silice transformés, peu polaires, de nature plutôt hydrophobe, on choisit comme phases mobiles des mélanges d'eau et d'un modifiant tel le méthanol ou l'acétonitrile. En changeant la composition de la phase mobile, donc sa polarité, on agit par l'intermédiaire des coefficients de distribution K (C_s/C_n) sur les facteurs de rétention k des composés.

Suivant les critères de choix escomptés de la méthode (énoncés dans l'objectif), les différents solvants utilisés sont:

- méthanol/eau (60:40; v/v) ;
- éthanol (100%) ;
- acétate d'éthyle/éthanol (70:30; v/v) ;
- acétate d'ammonium/méthanol (20:80; v/v). La solution tampon est préparée avec une solution d'acétate d'ammonium titrée à 10mM et le pH est ajusté à 4,5 en ajoutant quelques gouttes d'acide formique.
- dihydrogénophosphate de potassium/méthanol (60:40; v/v). La concentration du tampon phosphate est de 70 mM et le pH est ajusté à 3 en additionnant quelques gouttes d'acide orthophosphorique.
- acétonitrile/dihydrogénophosphate de potassium/méthanol (45:35:20; v/v/v).
- acétonitrile/dihydrogénophosphate de potassium/méthanol (15:30:55; v/v/v). La solution tampon est constituée à partir de poudre de dihydrogénophosphate de potassium mise en solution, à raison d'une concentration de 70mM, ramenée ensuite à pH 3 grâce à quelques gouttes d'acide orthophosphorique.

Les solvants utilisés sont tous de grade analytique et de marque PROLABO. Le pH-mètre est systématiquement étalonné avant toute utilisation. Toutes les solutions reconstituées sont filtrées et dégazées sous vide pour éviter l'entrée de bulles d'air dans la colonne.

Lorsque les chromatogrammes obtenus après plusieurs essais avec un solvant donné ne se sont pas avérés satisfaisants, la colonne et les canalisations de l'appareil CLHP sont d'abord purifiées pendant au moins une heure à l'aide de l'éluant de l'essai suivant, avant l'injection suivante. Cette purge de l'appareil est respectée à chaque changement du système éluant.

Les atténuations sont 1, 2, 3, 5, 7.

Les volumes d'injection testés sont 10 µl, 15 µl, et 20 µl.

Les longueurs d'onde (en nm) étudiées sont 220, 223, 226, 227, 230, 235, 240, 246 et 250.

Selon la composition de l'éluant, les débits (en ml/min) choisis sont 0,2 ; 0,5 ; 0,7 et 1.

L'appréciation des chromatogrammes s'est basée sur la distinction des pics, leur surface, leur reproductibilité, un temps de rétention acceptable, ainsi que la proportionnalité du signal par rapport à la concentration du produit injecté.

Préparation des échantillons plasmatiques

Un échantillon plasmatique est nécessaire pour valider que la méthode, mise au point, extraie l'amlodipine au niveau plasmatique et permette son identification. Pour ce faire, 5 ml de sang veineux sont prélevés.

Pour séparer le plasma du culot, le sang récolté dans un tube hémolytique est versé dans des tubes eppendorf à couvercle pour être centrifugé à 10000 tours/min pendant 10 min à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse thermostatée (Biofuge). Le plasma est délicatement récupéré et mis dans un tube à hémolyse.

Ensuite, 70 ng du PA sont ajoutés à 1 ml du plasma obtenu. Le tout est agité sur VORTEX pendant 1 min. Puis, 5 ml d'acétonitrile pour analyse (Merck) sont ajoutés à cette solution formée par le plasma et le PA. L'ensemble est de nouveau agité sur VORTEX pendant 10 min avant d'être centrifugé à 10000 tours/min à température ambiante. La centrifugation achevée, le surnageant est récupéré dans un tube à essais pour être évaporé sous vide à 40°C à l'évaporateur rotatif (Rotavapor R-114, Büchi). Ce résidu sec est ensuite solubilisé dans 1 ml du système éluant correspondant au mélange acétonitrile/dihydrogénophosphate de potassium/méthanol (15:35:55; v/v/v) et est agité au bain ultrasonique pendant 10 min avant d'être transvasé dans un vial pour l'injection en CLHP [32].

3.Applications : Comparaison des PA dans les préparations galéniques

Objectif

Cette opération a pour objectif de comparer d'une part, les variations de quantité en principe actif entre les comprimés appartenant aux lots de médicaments génériques et ceux du médicament de spécialité et d'autre part, les variations entre les différents lots de médicaments génériques.

Deux méthodes sont utilisées pour déterminer la teneur en principe actif de ces médicaments, la pesée directe sur balance de précision et le calcul de concentration à partir de la surface du pic en CLHP.

Matériels

Les échantillons ayant fait l'objet de ces pesées sont constitués de 3 échantillons d'AMLOPRES® 5 mg, un médicament générique à base d'amlodipine d'une part, et de 3 échantillons de AMLOR® 5 mg, un médicament de spécialité à base d'amlodipine d'autre part. Chaque échantillon est formé de 5 comprimés ou 5 gélules selon la forme galénique du médicament concerné.

Pour AMLOPRES®, les lots auxquels les comprimés appartiennent sont KW3618, X30957 et KW3619 dont les dates de péremptions sont respectivement juin, septembre et juin 2016. Pour AMLOR®, les 15 gélules appartiennent au lot 1A21E, et seront périmés en mai 2016.

Tous les principes actifs, sujets de cette opération, sont obtenus par extraction utilisant la même méthode mise au point au sein du laboratoire LPA-IMRA et décrite sur la *Figure 1*.

- Comparaison à la balance de précision

En plus des verreries, réactifs et appareillages utilisés pour l'extraction (*cf.* Matériels extraction), une balance de précision est utilisée pour la détermination de la quantité des produits obtenus.

L'utilisation de la balance de précision pour la pesée nécessite une période de pré-chauffage de 1 heure de l'appareil, pour que celui-ci se stabilise. Les tubes à essais préalablement pesés, contenant les extraits, sont placés un à un sur le plateau de la balance.

La masse est notée, après soustraction de la tare. Les moyennes et écart-types sont ensuite calculés.

- Comparaison en CLHP

Les matériels requis pour cette opération sont les mêmes matériels utilisés pour la mise au point de la méthode en CLHP (*cf.* 2. Mise au point d'une méthode de dosage en CLHP).

Mode opératoire

Les comprimés d'AMLOPRES[®] et les gélules d'AMLOR[®] constituant les 6 échantillons à analyser sont pris au hasard dans leurs boîtes respectives. Les différentes étapes de l'extraction du principe actif (*cf. Figure 1* Extraction) sont les mêmes pour le médicament générique et celui de spécialité. Les comprimés d'AMLOPRES[®] sont broyés dans un mortier tandis que les gélules d'AMLOR[®] sont ouvertes pour l'obtention de la poudre à travailler.

La phase mobile est composée du mélange acétonitrile/dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄)/méthanol (15:35:55; v/v/v), le tout ramené à pH 3 grâce à quelques gouttes d'acide orthophosphorique. Le pH mètre (Mettler) utilisé est systématiquement calibré avant toute utilisation.

La filtration et le dégazage du système éluant sont réalisés à l'aide d'une pompe sous vide pour éviter la présence de bulles d'air dans la colonne lors de la séparation. Ont suivi la mise en route de l'appareil CLHP, la purge de la colonne et des tuyaux avec la phase mobile filtrée et dégazée ainsi que le nettoyage de la boucle d'injection. Le débit est réglé à 1ml/min et la longueur d'onde à 230 nm. L'élution est faite en mode isocratique et à température ambiante.

Un mg de chacun des 6 extraits est dissous dans 1mL de méthanol pour obtenir les 6 solutions à analyser. L'injection, dont le volume est de 20 µl, se fait grâce à une seringue en verre après rinçage de celle-ci avec l'éluant. Ensuite, plusieurs injections de méthanol sont effectuées pour le rinçage de la boucle d'injection.

Après un temps d'analyse de 15 min, le chromatogramme est obtenu. Les temps de rétention sont notés et les quantités en principe actif sont calculées selon la formule suivante.

$$C = \frac{K \times A}{V} \quad (1)$$

Soit

$$K = \frac{C \times V}{A} \quad (2)$$

Avec :

C : Concentration de la solution injectée

K : Coefficient de réponse

A : Aire du pic

V : Volume de la solution injectée

Le calcul de la concentration en PA de la solution à doser en CLHP nécessite la détermination au préalable d'une grandeur caractéristique du produit appelé coefficient de réponse K . Pour ce faire, une gamme étalon réalisée grâce à différentes concentrations du produit de référence est établie (*Tableau VI*). Pour chacune d'elles, l'aire du pic est notée. Puis, grâce à l'équation (2), la valeur de leur coefficient de réponse est calculée. La moyenne de toutes ces valeurs donne le coefficient de réponse du PA recherché.

Tableau VI : Gamme étalon de l'amlodipine établie pour le calcul du coefficient de réponse K

	C_1	C_2	C_3	C_4
Concentrations (mg/ml)	0,312	0,625	1,250	2,500

4. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart type. L'écart-type S est obtenu par la formule suivante.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Avec :

S : écart type

$\bar{x}$: moyenne

x : une valeur incluse dans l'ensemble de données

n : nombre de tests réalisés

5. Analyse statistique

Pour la comparaison de deux moyennes, la méthode d'analyse de variance par le test « t de Student » est utilisée. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme différence statistiquement significative.

6. Limites de l'étude

D'autres tests pharmacotechniques et pharmacocinétiques sont nécessaires pour vérifier la qualité des produits.

7. Considérations éthiques

Il n'y a pas eu de conflit d'intérêt par rapport à ces laboratoires (*Annexe 7*).

II. RESULTATS

1. Identification de l'amlodipine extraite

1.1. CCM

La chromatographie sur couche mince du produit issu de notre extraction, utilisant comme éluant le mélange DCM/méthanol (90:10; v/v), a donné une monotache. Le chromatogramme est présenté sur la *Figure 13*. L'observation sous UV à 254 nm, met en évidence une tache de couleur bleue correspondant à une référence frontale $R_f = 0,26$.



Figure 13 : Chromatogramme du produit obtenu à partir des comprimés d'AMLO DENK[®]

1.2. Spectre de masse

L'ionisation par électrospray (ESI) en mode positif de notre échantillon a donné:

- un pic pseudo-moléculaire de $m/z = 409,2$ correspondant à $[M+H]^+$. C'est le pic de base, son abondance relative est 100%. La masse moléculaire de notre composé est donc 408,2. Elle correspond bien à la masse de l'amlodipine.
- trois pics fragments de $m/z = 238,1$; $294,1$ et $377,1$. Ils correspondent aux différents fragments de la molécule obtenue lors de l'ionisation (*Tableau VII*).
- d'autres pics de très faible abondance relative correspondant à des fragments obtenus par addition de certains éléments comme l'hydrogène et le sodium à l'ion pseudo-moléculaire lors du processus d'ionisation.

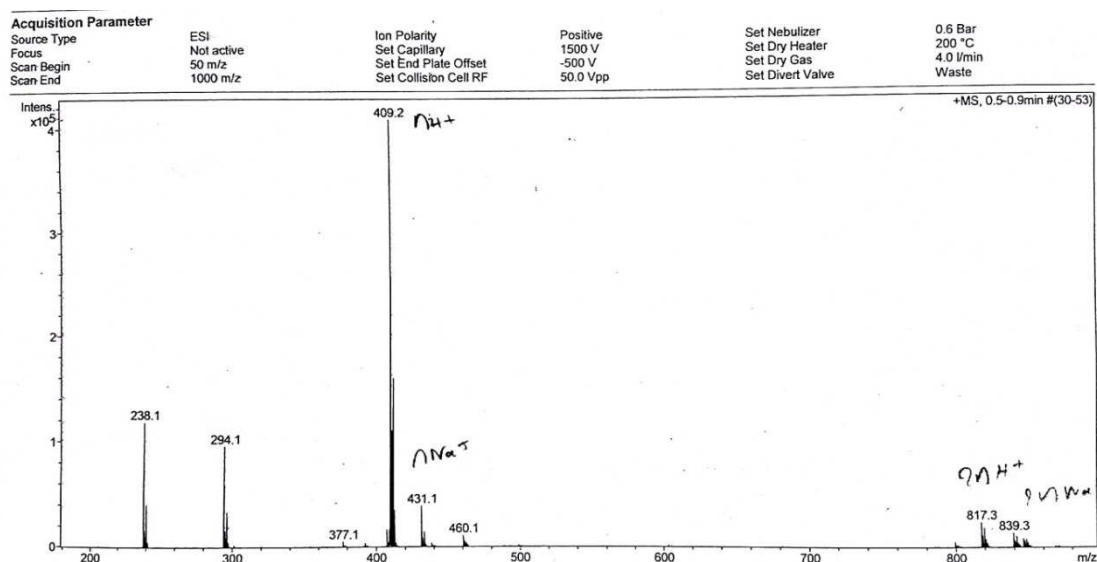
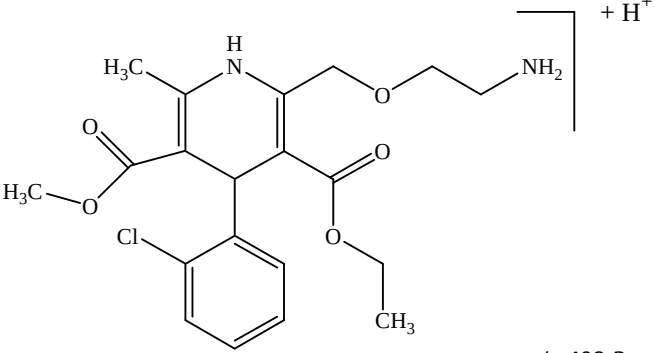
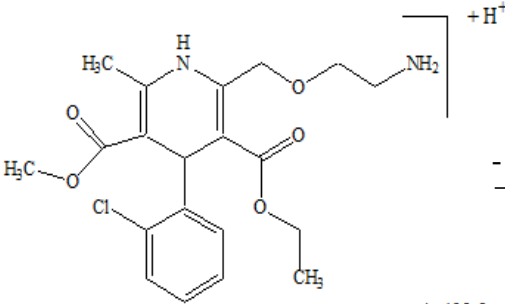
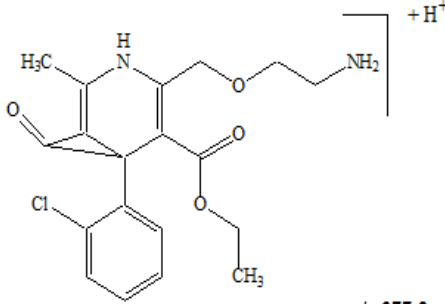
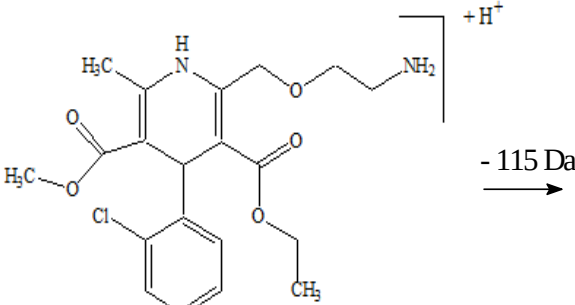
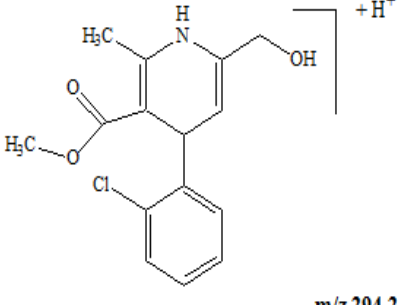


Figure 14 : Spectre de masse du produit obtenu à partir des comprimés d'AMLO DENK®

Tableau VII :Fragments du produit isolé obtenus par SM

Fragmentationproposée	
 $+ H^+$ m/z 409,2	
 $- 32 \text{ Da}$ m/z 409,2	 $+ H^+$ m/z 377,2
 $- 115 \text{ Da}$ m/z 409,2	 $+ H^+$ m/z 294,2

1.3. Spectroscopie RMN ^1H

L'interprétation du spectre RMN ^1H de notre produit (*Figure 15*) est réalisée grâce à la table de RMN du proton (*Annexe 1*) et par comparaison avec les données de la littérature [33, 34] et celles données par le logiciel Chemdraw. La transcription de chaque signal par rapport à son déplacement chimique respectif, ainsi que son environnement moléculaire nous a ensuite permis d'attribuer à chacun d'eux le groupement leur correspondant au niveau de la structure développée de l'amlodipine (*Figure 16*). Les résultats sont présentés dans le *Tableau VIII*.

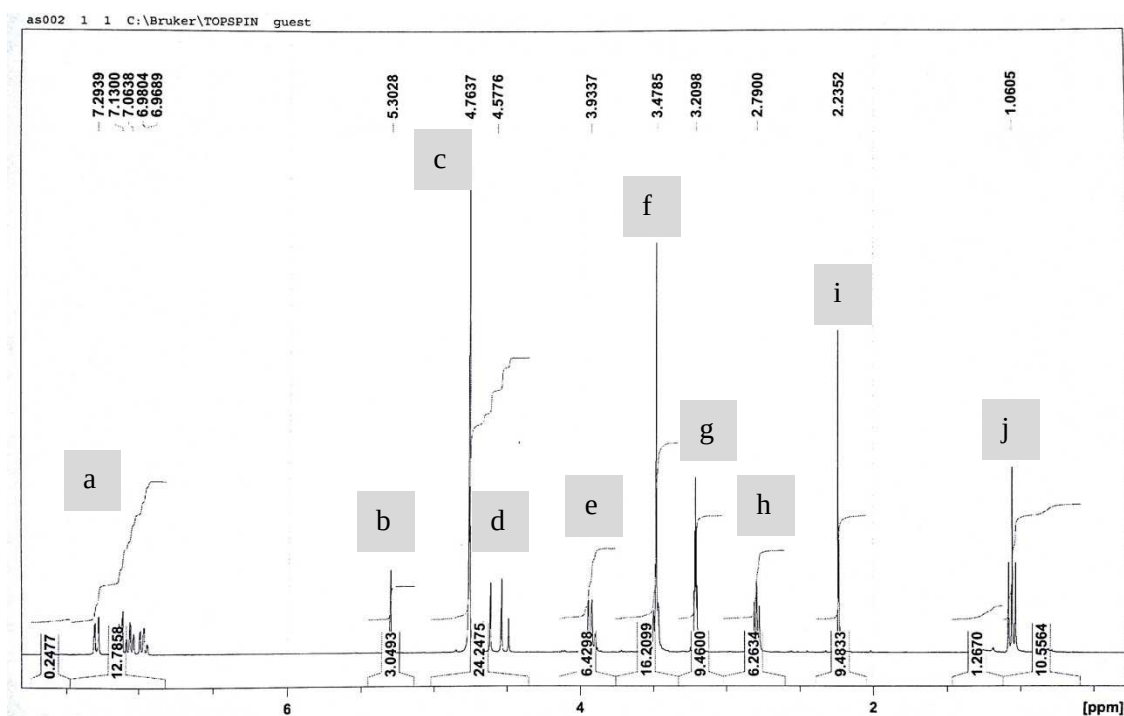


Figure 15 : Spectre RMN ^1H du produit obtenu à partir des comprimés d'AMLODENK[®] à 500MHz dans CD_3OD

Tableau VIII :Interprétation du spectre RMN ^1H du produit isolé

Signal	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Type	multiplet	singulet	singulet	quadruplet	triplet	singulet	singulet	triplet	singulet	triplet
Déplacement chimique (ppm)	7	5,30	4,77	4,58	3,93	3,48	3,21	2,79	2,23	1,06
Intégration	4H	1H	7H	2H	5H	3H	2H	3H	3H	3H
Site protonique	Ar	Ar-CH-Pyr	Pyr-CH₂-O	CH₃-CH₂-O	-CH₂-O	CH₃-O	-CH₃-OD	CH₂-NH₂	Pyr-CH₃	-CH₃

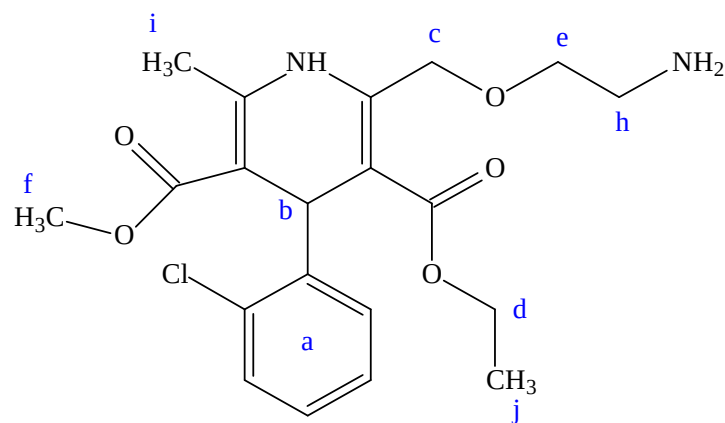


Figure 16 : Attribution des signaux au niveau de la structure de l'amlodipine

1.4. Spectre RMN ^{13}C Broadband decoupling

Ce spectre donne le nombre d'atomes de carbone de la molécule s'il n'y a pas de recouvrement de carbone. Le signal à $\delta = 51,2$ ppm correspond au solvant CD_3OD . Mis à part ce signal, nous dénombrons dans le spectre 20 pics correspondant aux 20 carbones de l'amlodipine.

L'attribution des déplacements chimiques des carbones du produit (*Figure 17*) est donnée dans le *Tableau IX*.

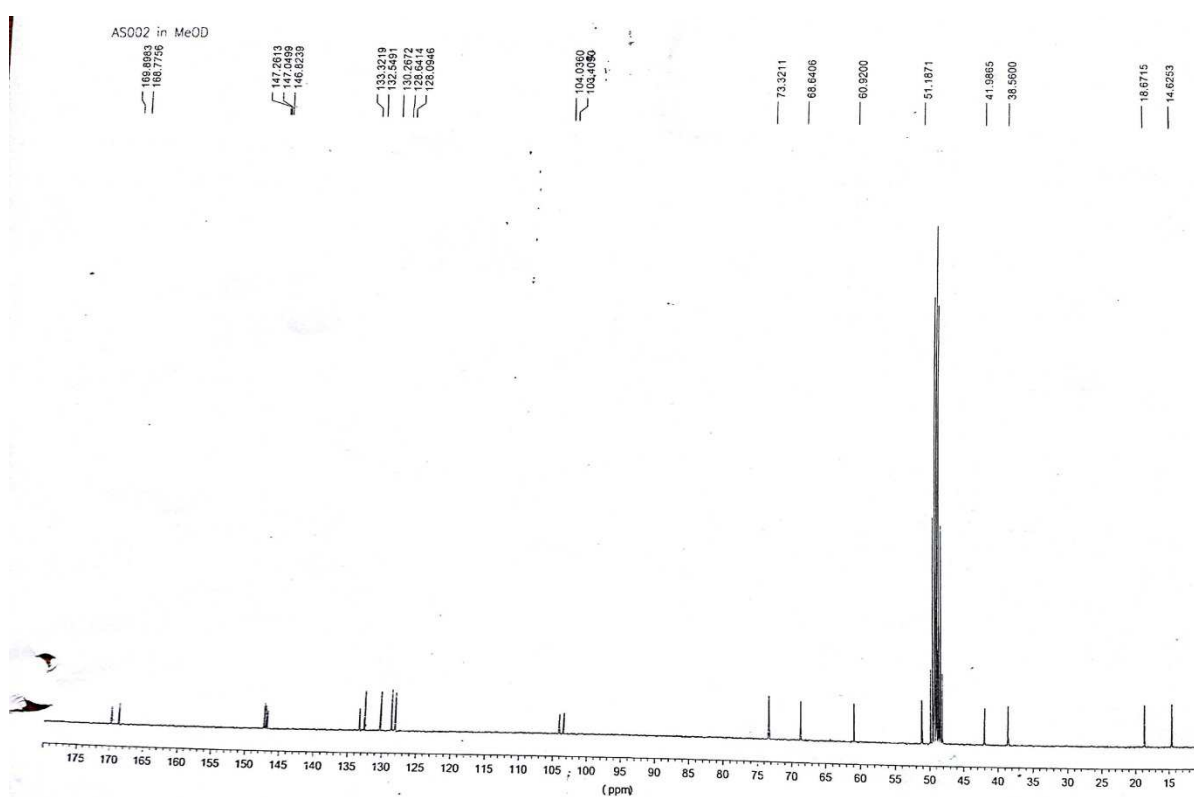
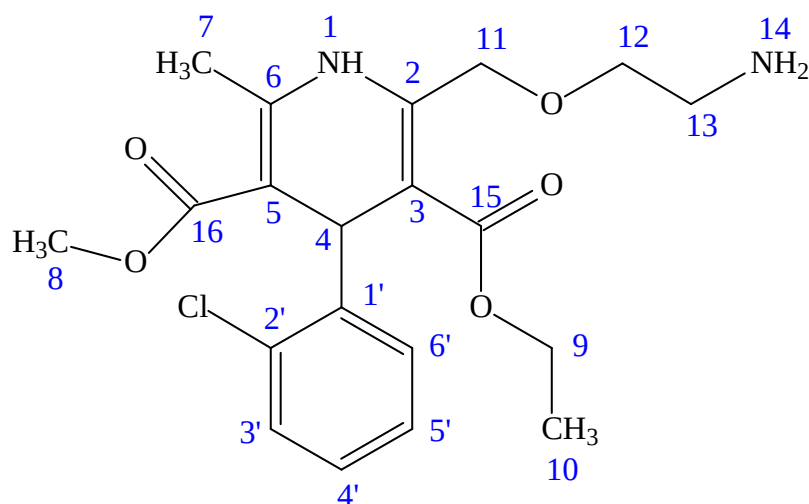


Figure 17 : Spectre RMN ^{13}C à 100MHz du produit obtenu à partir des comprimés d'AMLODENK[®] dans CD_3OD

Tableau IX: Attribution des signaux du spectre RMN ^{13}C du produit

N° atome	Déplacement chimique δ (ppm)	N° atome	Déplacement chimique δ (ppm)
2	147,0	12	73,32
3	104,0	13	41,98
4	38,56	15	168,7
5	103,4	16	169,8
6	147,2	1'	146,8
7	18,67	2'	133,3
8	51,18	3'	130,2
9	60,92	4'	128,6
10	14,6	5'	128,1
11	68,64	6'	132,5

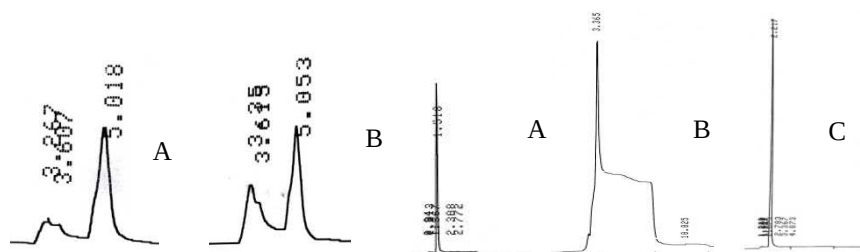
**Figure 18 : Formule développée et numérotation des atomes de l'amlodipine**

2. Mise au point d'une méthode de dosage en CLHP

2.1. Effets du système d'éluants

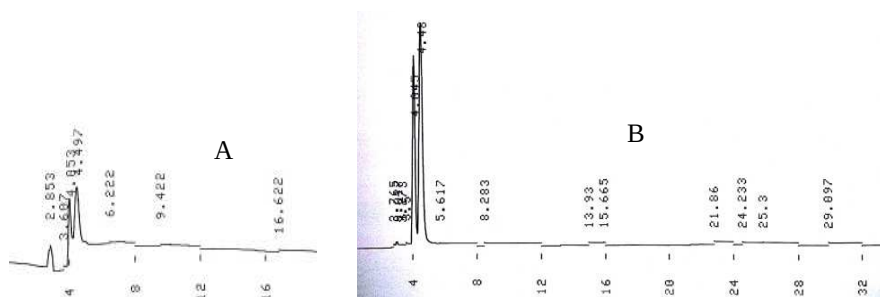
Les effets du système d'éluants utilisé sur la forme du chromatogramme sont montrés sur la *Figure 19*.

- Les chromatogrammes obtenus avec le solvant S1 mettent en évidence l'absence de pic de l'amlodipine dans les conditions chromatographiques utilisées.
- Les résultats obtenus avec l'éthanol n'ont pas été satisfaisants du fait de l'instabilité de la méthode en utilisant ce solvant.
- Le solvant S3 n'a pas révélé un pic correspondant à l'amlodipine.
- L'utilisation du solvant S4 montre un pic de l'amlodipine, mais avec cependant un aspect en plateau et un temps de rétention très important (>20 min).
- Le résultat obtenu avec le solvant S5 présente un temps de rétention important du produit ($t = 27,31$ min). De plus, l'absence d'horizontalité du signal traduit une difficulté à la stabilisation de la méthode utilisée.
- L'utilisation de l'acétonitrile dans la composition du solvant met en évidence la présence d'un pic de l'amlodipine, avec un aspect acceptable et reproductible sur d'autres injections du produit. La molécule sort à 5,47 min.
- L'acétonitrile ayant été jugé comme indispensable pour l'obtention de pics satisfaisants, son coût élevé nous a conduit à la reformulation de la composition d'un autre système éluant, le solvant S7.

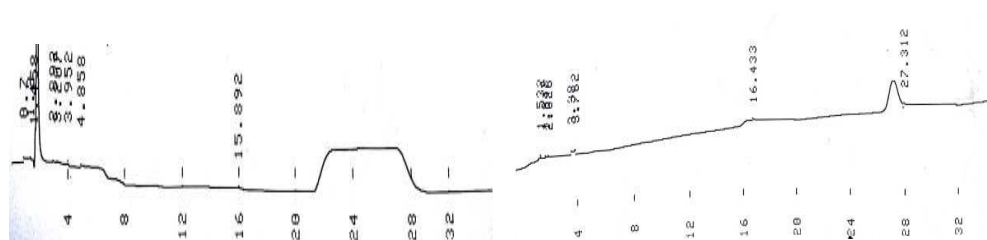


S1: Méthanol/Eau (60:40)

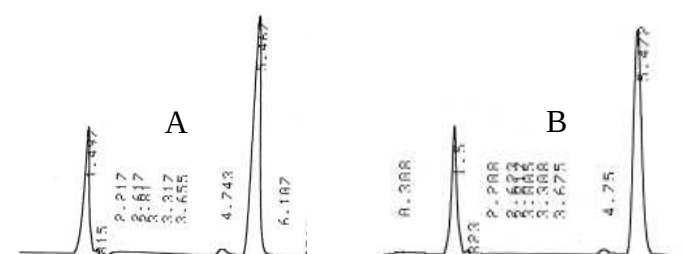
S2: Ethanol (100%)



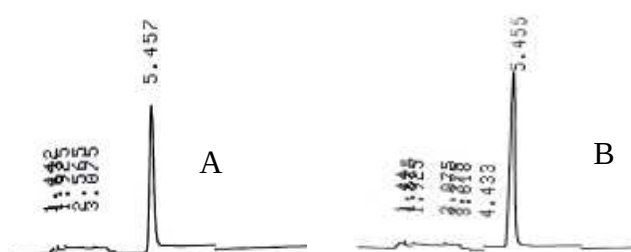
S3: Acétate d'éthyle/éthanol (70:30)



S4:Acétate d'ammonium/méthanol (20:80) S5:KH₂PO₄/Méthanol (60:40)



S6: Acétonitrile/KH₂PO₄/Méthanol (45:35:20)



S7: Acétonitrile/KH₂PO₄/Méthanol (15:30:45)

**Figure 19 : Chromatogrammes obtenus en fonction du système d'éluants
(A : injection du méthanol B et C : 1^{ère} et 2^{ème} injection)**

2.2. Mise au point de la longueur d'onde de détection

La modulation de la longueur d'onde utilisée lors des analyses a mis en évidence la reproductibilité des pics à $\lambda = 235$ nm (Figure 20).

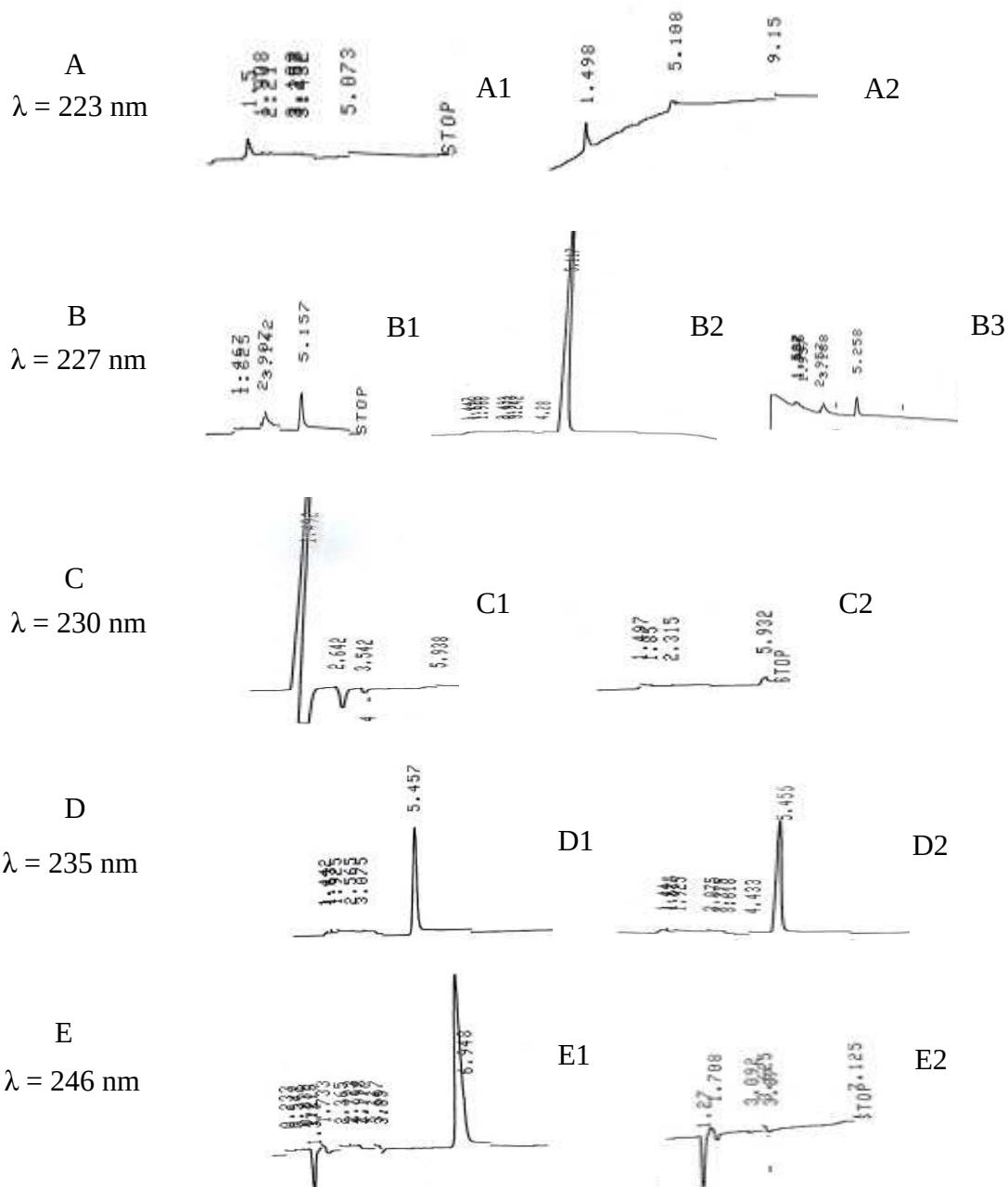


Figure 20 : Mise au point de la longueur d'onde pour l'analyse CLHP de l'échantillon élué avec S₇ (Acétonitrile/KH₂PO₄/Méthanol, 15:30:45; v/v/v) tels que 1, 2, 3 : 1^{ère}, 2^{ème} ou 3^{ème} injection

2.3. Ebauche d'une gamme étalon à $\lambda = 235$ nm

L'injection de différentes concentrations du produit à $\lambda = 235$ nm révèle l'existence d'une proportionnalité du signal par rapport à la concentration injectée (*Tableau X*).

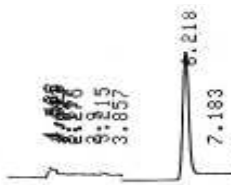
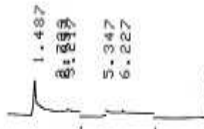
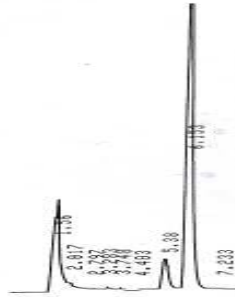
Tableau X : Mise en évidence de la proportionnalité du signal par rapport à la concentration à $\lambda = 235$ nm

Concentration en AML (mg/ml)	3	1	0,5
TR (min)	4,827	4,922	4,983
Aire du pic	3310821	1641432	811894

2.4. Essais sur le plasma à $\lambda = 235$ nm

La comparaison des chromatogrammes figurant dans les résultats obtenus sur les échantillons plasmatiques (*Tableau XI*) nous montre que la méthode utilisant le solvant S7 permet l'identification de l'amlodipine au niveau du plasma à $\lambda = 235$ nm.

Tableau XI : Mise en évidence de l'identification en CLHP de l'amlodipine avec le solvant S7 à $\lambda = 235$ nm

	AML 25 μ g/ml	Plasma blanc	Plasma + AML 70 μ g/ml
Chromatogramme			
TR (AML)	6,218		6,155

3. Applications : Comparaison des PA dans les formes galéniques

3.1. Comparaison à la balance électronique

La pesée à la balance électronique des extraits issus des formulations pharmaceutiques à comparer (*Tableau XII*) indique qu'en moyenne la masse d'AMLOPRES[®] est inférieure à celle d'AMLOR[®].

De plus, contrairement aux échantillons AMLOR[®], AMLOPRES[®] présente une variation inter-lot plus marquée ($22,8 \pm 1,1$ mg).

Tableau XII: Détermination de la masse des échantillons extraits des gélules d'AMLOR[®] et des comprimés d'AMLOPRES[®]

Produit		Quantité de PA extrait (mg)	Moyenne	Teneur relative en PA (%)	Moyenne
AMLOR [®]	Ech 1	24,9		99,6	
	Ech 2	24,8	24,9 $\pm$ 0,1	99,2	99,5 $\pm$ 0,2
	Ech 3	24,9		99,6	
AMLOPRES [®]	Ech 4	23,7		94,8	
	Ech 5	21,2	22,8 $\pm$ 1,1	84,8	91,1 $\pm$ 5,5
	Ech 6	23,4		93,6	

3.2- Comparaison en CLHP

La comparaison des échantillons en CLHP comprend l'appréciation de leurs temps de rétention sur les chromatogrammes obtenus (*Figure 21*) et la détermination de la quantité en PA dans les échantillons.

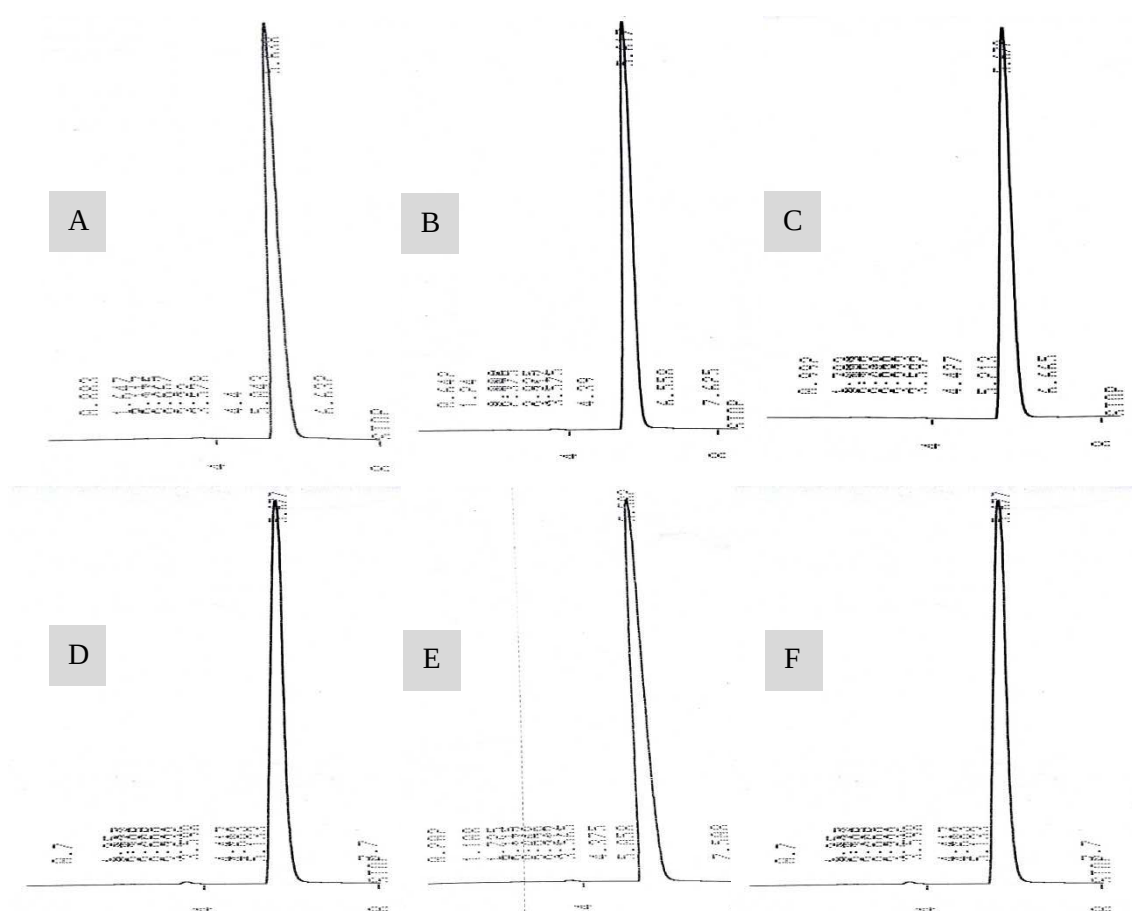


Figure 21 : Chromatogrammes obtenus lors du dosage en CLHP des échantillons à comparer A: Ech 1 B: Ech 2 C: Ech 3
D: Ech 4 E: Ech 5 F: Ech 6

Le *Tableau XIII* montre que, dans nos conditions d'analyse, le temps de rétention du PA des échantillons étudiés est compris entre 5,565 et 5,671 min. Il existe une légère variation de celui-ci entre les six échantillons, mais elle est inférieure à 5%.

Tableau XIII: Temps de rétention(TR) des échantillons extraits d'AMLOR[®] et AMLOPRES[®] (n=3)

Produit		TR (min)	CV (%)
AMLOR [®]	Ech 1	5,668±0,020	0,348
	Ech 2	5,692±0,018	0,307
	Ech 3	5,565±0,018	0,316
AMLOPRES [®]	Ech 4	5,642±0,050	0,879
	Ech 5	5,639±0,021	0,365
	Ech 6	5,671±0,003	0,047

Le calcul du coefficient de réponse K (*Tableau XIV*) est nécessaire pour la détermination de la masse du PA en CLHP.

Tableau XIV : Paramètres utilisés pour le calcul du coefficient de réponse K (n=3)

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Concentrations de référence en PA (mg/ml)	0,312	0,625	1,25	2,5
Volume injecté (µl)	10	10	10	10
TR (min)	5,56	5,51	5,54	5,57
Aire du pic	568679	1106692	2018429	3136173
K(10 ⁻⁶)	5,486	5,647	6,192	7,971

La moyenne des coefficients de réponse de chacune de ces concentrations donne le coefficient de réponse K de l'amlodipine pour le dosage des formes galéniques, avec $K = 6,324 \cdot 10^{-6}$ (*Tableau XV*). La courbe étalon construite avec K en fonction de C est caractérisée par l'équation $y = 1,1636x + 4,9606$ et le carré du coefficient de corrélation $R^2 = 0,98$. Elle a permis de calculer la concentration des solutions à doser.

Tableau XV : Dosage du PA des extraits issus d'AMLOR[®] et AMLOPRES[®] en CLHP

Produit	Quantité de PA extrait (mg)	Moyenne $\pm$ ET(mg)	Teneur relative en PA (%)	Moyenne $\pm$ ET (mg)	Rendement de l'extraction (%)
Ech 1	16,379		99,15		66,1
Ech 2	16,357	16,54 $\pm$ 0,24	98,98	100,10 $\pm$ 1,79	
Ech 3	16,884		102,17		
Ech 4	14,191		85,88		
Ech 5	13,301	13,91 $\pm$ 0,43	80,49	84,2 $\pm$ 3,21	
Ech 6	14,248		86,22		

En prenant la moyenne des quantités de PA obtenues du médicament de spécialité comme référence, le taux de rendement de l'extraction s'estime à 66,1%.

Les teneurs relatives en PA des 3 échantillons de médicament générique sont inférieures à 95%.

TROISIEME PARTIE :
DISCUSSION

I. DISCUSSION

1. Etude des résultats des tests d'identification de l'amlodipine extraite

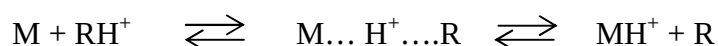
La présence d'une seule tache sur la plaque CCM pourrait mais ne traduit pas obligatoirement la pureté du produit isolé des comprimés d'AMLO DENK®.

En CCM, seule une analyse en deux dimensions (CCM 2D) permet d'affirmer à elle-seule la pureté d'un analyte. Ceci explique la nécessité d'autres méthodes analytiques pour vérifier la pureté de notre produit. Cette vérification est nécessaire pour démontrer que la méthode d'extraction utilisée, mise au point au cours de cette étude, soit jugée comme d'utilisation possible pour l'extraction de l'amlodipine ou d'autres molécules de la même famille chimique pour pallier l'inexistence des produits utilisables comme références. L'amlodipine appartient à la famille des dihydropyridines.

La phase mobile utilisée (DCM/méthanol (90:10; v/v)) a bien séparé l'analyte, dont la référence frontale dans cet éluant est 0,26. Les valeurs des R_f sur l'amlodipine trouvées dans la littérature corroborent notre résultat [35]. Les valeurs différentes observées dans d'autres références [36] sont dues à la dépendance du rapport frontal aux conditions chromatographiques utilisées.

Le R_f seul ne permet pas d'affirmer avec certitude, sans comparaison avec un produit de référence que le produit isolé soit de l'amlodipine. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir déterminer la structure chimique du produit obtenu. Nous avons ainsi eu recours aux spectrométries de masse, RMN¹H et ¹³C.

Le spectre de masse de notre échantillon met en évidence un pic prédominant correspondant à l'ion moléculaire protoné, $[MH]^+$ à m/z 409,2. Cet ion vient d'un transfert d'un proton selon la réaction :



Où RH^+ est l'ion du gaz réactif [26].

La masse moléculaire de l'amlodipine 408,2 [28], et les résultats d'études similaires rejoignent notre hypothèse [37, 38]. La différence par rapport à ces ouvrages réside dans la présence des pics se trouvant à droite du pic pseudo-moléculaire au niveau de notre spectre, c'est-à-dire de masse moléculaire plus grande. Si on en tient à la théorie, sur un spectre de masse ne peut figurer que le pic moléculaire, les pics fragments (de masse moléculaire inférieure au pic moléculaire) et de possibles pics isotopiques (de masse moléculaire supérieure au pic moléculaire et égal à $M+1$ ou $M+2$) [24]. Cet aspect du spectre est obtenu dans le cas des couplages SM-SM[37].

Dans notre cas, nous retrouvons des masses supérieures à la masse du pic de l'ion pseudo-moléculaire et différentes de $M+1$ et de $M+2$. Nous pourrions les interpréter comme suit :

- $m/z = 431,1$ pourrait correspondre à l'ion $[M+Na]^+$. Ainsi, il s'agirait de l'amlodipine qui aurait été sodée lors de l'ionisation. L'ion Na^+ provient de la matrice ;
- $m/z = 817,3$ pourrait être l'ion $[2M+H]^+$. Donc, il pourrait être perçu comme deux molécules d'amlodipine monoprotée ;
- $m/z = 839,3$ pourrait correspondre à l'ion $[2M+Na]^+$. Autrement dit, il s'agirait cette fois-ci de deux molécules d'amlodipine sodées.

L'ESI est effectuée en mode positif, ceci explique l'obtention d'ions de type $[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$.

Du fait de la forte abondance naturelle du proton (99,9%), le spectre RMN 1H est d'utilisation très courante pour la détermination du squelette hydrogène-carbone d'un composé [39]. De ce fait, plusieurs autres auteurs ont déjà analysé l'amlodipine par RMN 1H , contrairement à la publication de Szabo L. & coll, selon laquelle aucune étude RMN 1H de cette molécule n'a été reportée dans la littérature [33].

Concernant nos résultats, tous les signaux qui ont été nommés **a à j** pour faciliter leur interprétation, ont pu être attribués aux atomes d'hydrogène de la molécule. Nous retrouvons des spectres de même aspect dans les résultats d'autres chercheurs

[34,40]. De même, la comparaison des déplacements chimiques de notre produit aux données du logiciel Chemdraw et Szabo & coll [33] montre une analogie de ces valeurs.

Tableau XVI: Comparaison des valeurs de δ ^1H obtenus à celles du logiciel Chemdraw

Proton	Déplacement chimique δ (ppm)		
	Logiciel Chemdraw	Echantillon	Szabo & coll [33]
a	$\pm 7,00$	$\pm 7,00$	$\pm 7,34$
b	4,43	5,30	5,31
c	4,04	4,76	4,63
d	4,19	4,58	3,99
e	3,63	3,93	3,66
f	3,76	3,48	3,51
h	2,82	2,79	3,09
i	1,71	2,23	2,3
j	1,30	1,06	1,11

- Le signal **f** correspond à cinq protons dont trois du groupement $-\text{CH}_3$ adjacent au groupement ester et deux protons appartenant au groupement amine primaire. La valeur du déplacement chimique de $-\text{NH}_2$ peut être très variable;
- Le signal **g** est celui du solvant MeOD ;
- L'intégration 24,25 englobant les pics **c** et **d**, correspond à environ sept protons. Ils comprennent deux protons du pic **c**, deux protons du pic **d** ; les trois autres protons pourraient provenir de trace d'eau dans le solvant d'enregistrement et du proton de l'amine secondaire.

Sur le spectre RMN ^{13}C Broadband Decoupling, nous avons observé vingt pics que nous avons attribués aux vingt carbones de l'amlodipine. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones, comparées à celles données par le logiciel Chemdraw sont sensiblement les mêmes

Tableau XVII: Comparaison des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ obtenus à celles du logiciel Chemdraw

N° atome	Déplacement chimique δ (ppm)		
	Logiciel Chemdraw	Echantillon	Szabo & coll [33]
2	145,6	147,0	145,7
3	99,2	104,0	102,5
4	21,2	38,5	39,1
5	102,4	103,4	102,6
6	141,2	147,2	145,0
7	18,6	18,6	18,7
8	50,8	51,1	51
9	59,9	60,9	59,9
10	13,7	14,6	14,5
11	73,1	68,6	67,1
12	74,4	73,3	67,1
13	43,1	41,98	37,2
15	165,0	168,7	167,6
16	165,0	169,8	166,7
1'	138,1	146,8	
2'	134,5	133,3	
3'	128,8	130,2	
4'	126,9	128,6	
5'	126,5	128,1	
6'	130,6	132,5	

Par ailleurs, les travaux effectués par Szabo L. *et al.* sur l'étude spectroscopique et théorique du bésylate d'amlodipine [33] et ceux de Yang C. *et al.* sur la RMN ^1H et ^{13}C de l'amlodipine [40] corroborent nos résultats. La seule différence observée est la présence d'un signal supplémentaire dans le spectre que l'on peut attribuer au solvant MeOD à $\delta = 51,2$ ppm dans notre cas et DMSO- d_6 à $\delta = 39,5$ ppm dans celui de Yang C. *et al.*

Ceci souligne l'importance de la connaissance des conditions d'analyse lors de l'interprétation d'un spectre RMN. Cette étude nous expose aussi que les résultats expérimentaux de tels travaux peuvent être différents de la théorie. Cependant, cette technique reste quand même une méthode efficace pour déterminer le squelette carboné d'un composé.

L'enregistrement de spectres RMN 2D (NOESY, HMQC, HMBC, ...) aurait été un atout dans notre travail.

A ce stade de nos interprétations, l'identification de la masse moléculaire de l'amlodipine grâce au spectre de masse, l'attribution des déplacements chimiques des signaux du spectre RMN ^1H aux protons au niveau de la structure chimique, et l'attribution des vingt signaux RMN ^{13}C aux vingt carbones de notre molécule permet de déduire que le produit issu de l'extraction est bien l'amlodipine. Cependant, la pureté du produit n'est pas encore confirmée.

2. Etude des résultats de la mise au point d'une méthode de dosage en CLHP

L'analyse en CLHP de la molécule d'amlodipine n'est pas une première dans le monde de la recherche. Plusieurs de ces études ont déjà été rapportées dans la littérature, avec des méthodes validées, en plus des protocoles recommandés dans les référentiels approuvés tels que la Pharmacopée Européenne [28, 36, 41]. Le choix d'une nouvelle mise au point de la méthode de dosage de l'amlodipine dans ce travail est justifié par le but initial qui était de trouver une méthode permettant une bonne identification de la molécule étudiée mais de moindre coût et utilisant des solvants et réactifs facilement accessibles à Madagascar.

Ainsi, la première mise au point a consisté à rechercher le solvant qui pourrait répondre aux critères attendus énoncés précédemment, en commençant par le mélange méthanol-eau.

Les chromatogrammes obtenus se sont avérés non satisfaisants, présentant des pics non acceptables, non reproductibles, avec un temps de rétention trop important (TR= 27 min), impliquant l'utilisation d'une plus grande quantité de solvants et

un temps d'analyse plus long, ou parfois l'absence totale de pic correspondant à l'amlodipine.

Le système $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{MeOH}$ a été essayé au cours de cette mise au point mais donne un temps de rétention trop important. La composition-clé du système éluant semblerait être le système acétonitrile/système tampon/méthanol, le tout ajusté à $\text{pH} = 3$ [32,42]. Ceci est prouvé sur la *Figure 19*.

La composition du solvant a tout de même été rectifiée afin de réduire au maximum la proportion en acétonitrile [43] et donc le coût des analyses. Nous avons nommé ce dernier solvant S7. Remarquons que les publications concernant les études réalisées sur l'analyse en CLHP de l'amlodipine reportent la présence d'acétonitrile et d'une solution tampon dans la composition du système éluant leur permettant une bonne identification de la molécule [28, 32, 42].

A ce stade de la mise au point, l'amlodipine a été identifiée par un pic simple, d'aspect fin et symétrique. Ce paramètre valide notre hypothèse émise lors des analyses antérieures concernant la pureté de notre extrait.

Les valeurs de TR correspondant à l'amlodipine extraite varient de 4,80 min à 5,80 min. Nous obtenons un TR se rapprochant des données publiées antérieurement [36, 41]. Nous avons constaté que lorsque l'intervalle de temps entre la préparation du solvant et l'analyse est trop grand, le TR de l'amlodipine augmente. Ce fait pourrait être à l'origine de variation intra-day, un phénomène classique en analyse sur CLHP. L'idéal aurait été de travailler avec un solvant fraîchement préparé. Cependant cela ne semble pas possible du fait de la nécessité de plusieurs heures pour nettoyer les canalisations de l'appareil CLHP et pour sa stabilisation. D'ailleurs, les auteurs ayant aussi fait des études semblables recommandent l'utilisation d'un solvant fraîchement préparé [44].

La longueur d'onde a été modulée dans le but de peaufiner les résultats obtenus lors de cette identification de l'amlodipine. Pour notre part, l'aspect des pics a été satisfaisant et reproductible à $\lambda = 235 \text{ nm}$. Nous retrouvons dans la littérature le choix de longueurs d'ondes apparentées pour l'identification de cette molécule [45].

Les premiers résultats obtenus des échantillons plasmatiques se révèlent positifs pour notre étude car les pics obtenus sont isolés et ne s'interfèrent pas avec d'autres composants qui pourraient être présents dans le plasma. Cependant, nous avons observé la présence de deux pics sur le chromatogramme, indiquant probablement l'oxydation du produit dans le plasma [35, 46].

Si nous nous référons à des études menées dans d'autres pays tels que la Chine, la Turquie ou encore le Canada [40, 41], l'utilisation de standard interne pour le dosage de l'amlodipine est pratique courante. Par faute de réactifs, le dosage de l'amlodipine n'a pas été effectué en utilisant un standard interne au cours de notre travail.

De plus, le choix de la méthode de dosage (en spectrophotométrie UV-visible) a découlé de sa disponibilité dans le laboratoire d'analyses. Toutefois, la présence de groupement pharmacophore est indispensable dans une molécule pour pouvoir être détecté en UV. Plusieurs autres techniques sont aussi possibles. La CLHP de l'amlodipine peut être couplée au spectromètre de masse [46], ou encore à la fluorimétrie [47,48].

3. Comparaison des échantillons extraits d'AMLOR[®] et de AMLOPRES[®]

L'objectif initial de ces différentes mises au point concernant la technique d'extraction ou encore la méthode de dosage était de faire une comparaison chimique, et même pharmacocinétique de ces médicaments à base d'amlodipine commercialisés dans notre pays (étude de bioéquivalence).

Concernant la comparaison de la quantité en amlodipine dans les formes pharmaceutiques (comprimés et gélules), les résultats de la pesée à la balance électronique mettent en exergue ces quelques points.

D'une part, nous constatons que la variation de la quantité du PA des 3 échantillons du médicament de spécialité est faible par rapport à celle des 3 lots du médicament générique. En effet, l'écart-type à la moyenne de ces derniers est plus important que pour l'AMLOR[®] mais elle est inférieure à 5%, le seuil de variation acceptable.

D'autre part, la moyenne de la masse des échantillons AMLOPRES[®] est inférieure à celle d'AMLOR[®] ($24,9 \pm 0,1$ mg pour AMLOR[®] contre $22,8 \pm 1,1$ mg pour AMLOPRES[®]). Cette différence est considérée comme statistiquement significative, avec $p=0,01$.

Nous pouvons déduire de ce premier constat qu'il existe vraisemblablement une différence dans la composition quantitative en PA des deux médicaments. Ce point de non-conformité pourrait constituer la première preuve de la difficulté d'affirmer l'équivalence de ces deux médicaments. Certes, tous deux ont pour effet thérapeutique la diminution de la pression artérielle du patient [29, 30], mais l'interchangement des médicaments entre eux lors d'un traitement depuis longtemps établi pourrait constituer un risque pour la santé du patient (la dose quotidienne atteignant la circulation générale pouvant être faible avec l'AMLOPRES[®]).

Si nous nous référons à la théorie, un médicament ne peut être appelé générique que s'il contient la même composition qualitative et quantitative en PA que le médicament princeps [17, 18]. Dans notre cas, notre première conclusion éliminerait directement l'AMLOPRES[®] des médicaments considérés comme générique de AMLOR[®] 5 mg. Cependant, pour ne pas tirer de conclusion hâtive, il nous faut nous référer aux études similaires d'autres chercheurs.

Ainsi, l'appréciation de la quantité de PA dans les formes pharmaceutiques à la balance électronique ne semble pas être courante. Nous retrouvons plutôt des comparaisons de la composition en PA par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV utilisant la loi de Beer Lambert ou par titrimétrie [49].

D'autres paramètres pourraient aussi expliquer ce résultat, comme des erreurs possibles dans les différentes manipulations, la différence des formes galéniques des médicaments (comprimés et gélules), ou encore le doute lors de l'obtention de l'extrait à peser sous forme de pâte mais non pas sous forme cristallisée (l'évaporation aurait pu être plus ou moins importante que celle voulue).

Ces différents points justifient la nécessité de confirmer le dosage réel en PA des médicaments à analyser au moyen d'une analyse CLHP.

Les résultats obtenus en CLHP confortent les précédents. En effet, nous retrouvons encore la conformité dans la masse au sein des échantillons 1, 2, et 3 (CV= 1,45%) par rapport aux échantillons 4,5, et 6 où la variation est plus importante (CV = 3,12%).

De plus, tout comme pour la comparaison à la balance électronique, la moyenne de la masse des échantillons génériques est notablement inférieure à celle des échantillons du médicament de spécialité (13,91±0,43 mg pour AMLOPRES[®] contre 16,54±0,24 mg pour AMLOR[®]). En tenant compte de notre rendement d'extraction qui est de 66,1%, les cinq comprimés d'AMLOPRES[®] contiennent donc 21,04 mg contre 25,02 mg pour AMLOR[®]. Ces données confirment donc les premières conclusions tirées auparavant. AMLOPRES[®] contient moins de PA qu'AMLOR[®]. Ceci pourrait constituer un risque pour le patient en cas de substitution de ces médicaments en officine, mais pourrait aussi induire une insuffisance dans l'effet thérapeutique escompté chez le patient pour lequel le clinicien prescrit AMLOPRES[®].

Les publications retrouvées dans la littérature portant sur le dosage de l'amlodipine dans les médicaments ont plutôt pour but la validation de méthodes d'analyse, mais non la comparaison de la qualité de ces dits médicaments [50]. Il s'agit le plus souvent d'analyses CLHP utilisant des conditions semblables à la dernière que nous avons retenue dans notre mise au point. La composition en acétonitrile, solution tampon, ainsi que l'ajustement du pH du système solvant aux alentours de pH = 3 se répètent dans ces publications, la solution tampon permettant d'éviter l'apparition de pics multiples en CLHP en phase inverse [28, 42, 44].

Des études menées par d'autres chercheurs portent effectivement sur la comparaison de la qualité de différentes formulations à base d'amlodipine. Mais leur but n'est pas de comparer les masses en PA contenu dans les médicaments, mais plutôt au niveau d'échantillons plasmatiques (études de bioéquivalence directement) [32, 37, 42].

En outre, la méthode adoptée dans notre travail diffère des protocoles classiques, qui elles, consistent à établir une courbe d'étalonnage pour la détermination des concentrations à rechercher [51]. Nous avons eu recours au calcul du coefficient de réponse K comme expliqué dans les méthodes.

Notre étude s'est achevée à la mise au point de la méthode de dosage appliquée aux échantillons plasmatiques (réglage de la machine CLHP, atténuation du signal, débit, calcul du coefficient de réponse) pour diverses raisons.

Les différents points constatés dans les résultats de notre étude nous amènent à ces quelques suggestions.

Le Ministère de la Santé pourrait prendre en compte l'importance des missions de l'AGMED dans la promotion de la qualité des médicaments circulant sur le territoire national. Ainsi, la mobilisation des ressources matérielles, financières et humaines pour cette structure permettra d'optimiser le rôle de celle-ci dans la promotion de la santé publique.

L'AGMED, avec l'appui du Ministère de la Santé, devrait s'approvisionner en substances de référence, ne serait-ce que pour que les médicaments essentiels, comme dans le cas de l'amlodipine par exemple. Ainsi, les substances de référence seraient plus faciles d'accès pour les chercheurs désirant réaliser des études semblables.

D'autre part, outre les données pharmacodynamiques et pharmacocinétiques du produit, la preuve de la soumission de celui-ci à des études de bioéquivalence par rapport à un médicament de spécialité devrait aussi figurer dans la liste des pièces à fournir pour l'enregistrement des médicaments génériques. Ainsi, l'établissement d'un répertoire générique à l'instar de celui de l'ANSM pour la France pourrait être possible. Cette liste comprendrait seulement les génériques ayant été positifs aux tests de bioéquivalence et servirait de référence pour la substitution par le pharmacien, ou encore pour le choix des médicaments à prescrire par le clinicien.

Enfin, l'Agence devrait renforcer ses actions dans la sensibilisation des pharmaciens, cliniciens, voire même des patients quant à la notification des effets indésirables des médicaments et produits de santé, ce qui n'est pas encore pratique courante dans notre pays. Ces données, propres aux médicaments circulant dans notre pays, notamment les génériques en provenance de l'Inde dont le nombre est en augmentation incessante et ne faisant nullement l'objet de recommandations publiées par l'ANSM, pourraient être communiquées via le site de l'AGMED pour l'information des professionnels de santé.

Le pharmacien d'officine, tenant un rôle primordial dans la prise en charge du patient par sa qualité de dispensateur du médicament, devrait être vigilant en cas de substitution, notamment lors de traitements au long cours comme l'hypertension artérielle. La déstabilisation de l'équilibre tensionnel déjà établi pourrait être dangereuse pour le patient, ce qui nous pousse à recommander à ne délivrer que le médicament initialement prescrit pour l'hypertendu, ou par défaut le remplacer par un autre médicament ayant été prouvé comme lui étant bioéquivalent.

Il devrait assurer aussi une formation adéquate à ses agents de comptoir concernant les règles de la substitution en général.

II. PERSPECTIVES

Notre étude s'est arrêtée à la comparaison à la balance électronique et en CLHP des comprimés d'AMLOPRES® et des gélules d'AMLOR®. Des études pharmacocinétiques, c'est-à-dire au niveau plasmatique, pourront compléter les résultats trouvés afin d'établir la notion de bioéquivalence ou non entre ces médicaments.

Dans le même ordre d'idée, des études similaires pourront être effectuées sur les autres médicaments à base d'amlodipine commercialisés dans notre pays, voire même tout autre médicament dihydropyridinique utilisé pour le traitement de l'hypertension artérielle.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les études portant sur la bioéquivalence de formulations à base d'amlodipine sont très nombreuses. Les référentiels tels que la Pharmacopée Européenne ont déjà défini, eux aussi, des méthodes d'identification et de dosage validées de cette molécule. Cependant, comme le laboratoire dans lequel nous avons travaillé promeut la chimie verte à Madagascar, le défi est de ne pas se suffire de ces protocoles recommandés, mais au contraire d'essayer des techniques nouvelles, utilisant des réactifs et matériels disponibles dans le pays.

D'une part, nos résultats ont prouvé que le manque de produit de référence dans le pays n'a pas constitué un obstacle pour notre travail. Les résultats des tests d'identification de l'amlodipine issue des comprimés montrent que la méthode expérimentée a été efficace dans l'extraction du PA, avec un rendement s'estimant à 66,1%. Ce produit pur obtenu peut servir de substance de référence pour le dosage de la molécule dans les préparations galéniques ou au niveau plasmatique.

D'autre part, le principe de la recherche d'une composition du système d'éluants peu coûteuse pour l'identification du produit en CLHP s'est révélé peu applicable, le solvant donnant une bonne séparation du produit reste l'addition de l'acétonitrile, du méthanol et un tampon phosphate, sans oublier l'ajustement du pH de cet ensemble à 3.

La comparaison de la composition quantitative en PA des deux formulations montre le sous-dosage du médicament générique par rapport au médicament princeps. Cette observation remet donc en question le pouvoir de substitution du pharmacien d'officine pour ce type de médicament dans notre pays.

Toutefois, le recours à une substance de référence aurait été plus bénéfique pour les résultats de notre travail. De plus, ces comparaisons par rapport à la quantité en PA contenu dans ces formulations ne suffisent pas à elles-mêmes à conclure sur le contrôle qualité de ces médicaments. D'autres tests pharmacotechniques sont nécessaires, sans parler des études pharmacocinétiques au niveau plasmatique. Nous recommandons donc à ceux qui projettent de continuer cette étude ou comparer cette-

fois-ci AMLOR[®] à un autre générique de s'approvisionner en amlodipine de référence pour une bonne validité de leurs résultats.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Organisation Mondiale de la Santé. Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles 2010. Résumé d'orientation. OMS, Genève, 2011: p. 2.
2. Organisation Mondiale de la Santé. Maladies cardio-vasculaires. OMS, Genève, 2013, Aide-mémoire n° 317. Consultable à l'URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>. [Consulté le 01/09/2014].
3. World Health Organization. World health statistics 2014, Part III Global health indicators. WHO, 2014: p. 123.
4. Videau JY. La qualité des médicaments dans les pays les plus défavorisés. Med Trop. 2006;66(6):533-7.
5. Barbereau S. La contrefaçon des médicaments : un phénomène en pleine expansion. Med Trop. 2006;66(6):529-32.
6. Organisation Mondiale de la Santé. Médicaments faux/faussetment étiquetés/falsifiés/contrefaits. OMS, Genève, 2012, Aide-mémoire n° 275. Consultable à l'URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/fr/>. [Consulté le 01/09/2014].
7. Medicines and Healthcare products. Regulatory Agency Huge amount of fake sex medicines seized in joint international raids. Rapport de presse. MHRA, 2012. Consultable à l'URL: <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20141205150130/http://www.mhra.gov.uk/NewsCentre/Pressreleases/CON146764>. [Consulté le 01/09/2014].

8. Organisation Mondiale de la Santé. La qualité des médicaments sur le marché africain - étude analytique dans trois pays : Cameroun, Madagascar, Tchad. OMS, 1995. Série de recherche; 18: p.76.
9. République Malgache. LOI n°2011-002 portant Code de la Santé. MinSanP,2011. Consultable à l'URL: <http://fmcmada.info/AVRIL2012/codesante.pdf>. [Consulté le 01/09/2014].
10. République Française. Code de la santé publique, Article L5121-1, Ministère de la Santé, 2001. Consultable à l'URL : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665>. [Consulté le 01/09/2014].
11. Les Entreprises du Médicament. Cycle d'un médicament. LEEM, 2013. Consultable à l'URL:<http://www.leem.org/node/53770>. [Consulté le 01/09/2014].
12. Boukris S. Médicaments génériques, la grande arnaque. Du Moment, Paris ; 2013: p.137.
13. Pfizer. Médicaments “me too”. Rapport d'information. Pfizer, Belgique, 2007 : 3 p. Consultable à l'URL: http://www.pfizer.be/sites/be/fr/media/publications_and_point_of_view/Documents/StandpuntenlongMetoogeneesmiddelenF.pdf. [Consulté le 01/09/2014]
14. Institut Suisse des Produits Thérapeutiques. Ordonnance sur l'autorisation simplifiée et l'annonce obligatoire des médicaments. ISPT, Suisse, 2001: 8 p. Consultable à l'URL:<https://www.admin.ch/opc/fr/official-compilation/2001/3469.pdf>. [Consulté le 05/05/2015]

15. Agence nationale du médicament et des produits de santé. Les médicaments génériques : des médicaments à part entière. Agence nationale du médicament et des produits de santé, France, 2012: p.67.
16. Association des professionnels du médicament générique – GEMME. Evolution du marché des médicaments génériques. GEMME, 2015. Consultable à l'URL: <http://www.medicamentsgeneriques.info/le-medicament-generique/chiffres-cles/>. [Consulté le 11/02/2015]
17. Mutualité française. Les médicaments génériques. « Dix propositions pour restaurer la confiance ». Rapport de la mutualité française, 2012: p.165.
18. Académie nationale de pharmacie. Médicaments génériques. Rapport de l'académie nationale de pharmacie, Paris, 2012: p.88.
19. Agence du médicament de Madagascar. Rôles et missions. AGMED, 2014. Consultable à l'URL: http://www.agmed.mg/index_fichiers/Role_missions.htm. [Consulté le 01/09/2014].
20. Chow SC. Bioavailability and bioequivalence in drug development. WIREs Comput Stat. 2014;6:304–12.
21. Agence du Médicament de Madagascar. Enregistrement des médicaments à Madagascar, manuel des procédures. AGMED, 2013. Consultable à l'URL: http://www.agmed.mg/index_fichiers/service_enregistrement.htm. [Consulté le 01/09/2014].
22. European Medicines Agency. Guideline on the investigation of bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr, Londres, 2010: p. 27.
23. Tissue BM. Making measurements. Basics of Analytical Chemistry and Chemical Equilibria. 2013;1:1-52.

24. Tissue BM. Analytical separations. Basics of Analytical Chemistry and Chemical Equilibria. 2013;10:307-406.
25. Balci M. Basic ¹H- and ¹³C-NMR Spectroscopy. Ed. Masson, Paris ; 2005: p.430.
26. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Mass spectrometry.Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis.2011;16:231-59.
27. Dorosz P, Vital D, Le Jeune C. Guide pratique des médicaments. 32ème édition, Ed. Maloine, Paris, 2013;p.554-5.
28. Pharmacopée Européenne. Monographies A, 6ème édition. Phar Eur. 2008;6(2);1271-3.
29. Vidal.L'amlor dans Le Dictionnaire. Vidal Eds, Paris, 2013:105-6.
30. Pfizer. Monographie Norvasc. Pfizer, Canada, 1992, 35 pages. Consultable à l'URL: http://www.pfizer.ca/fr/our_products/products/monograph/129. [Consulté le 01/09/2014]
31. Agence du médicament de Madagascar. Liste des médicaments enregistrés à Madagascar par titulaires d'AMM. AGMED, 2014, 35 p. Consultable à l'URL:http://www.agmed.mg/Pdf/Liste_AMM_2014.pdf. [Consulté le 01/09/2014]
32. Shah S, Asnani AJ, Kawade DP, Dangre SC, Arora SK, Yende SR. Simultaneous quantitative analysis of olmesartan medoxomil and amlodipine besylate in plasma by high-performance liquid chromatography technique.J Young Pharm. 2012;4(2):88-94.

33. Szabo L, Chis V, Pirnau A, Leopold N, Cozar O, Orosz S. Spectroscopic and theoretical study of amlodipine besylate. *J Mol Struct.* 2009;924(6):385-92.
34. Reddy GVR, Kumar AP, Reddy BV, Sreeramulu J, Park JH. Separation, identification and structural elucidation of a new impurity in the drug substance of amlodipine maleate using LC-MS/MS, NMR and IR. *Croat Chem Acta.* 2010;83(4):443-9.
35. Pandya KK, Milan S, Gandhi TP, Modi IA, Modi RI, Chakravarthy BK. Detection and determination of total amlodipine by high-performance thin-layer chromatography: a useful technique for pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995;667(2):315-20.
36. Meyyanathanl SN, Suresh B. HPTLC Method for the Simultaneous Determination of Amlodipine and Benazepril in Their Formulations. *J Chromatogr Sci.* 2005;43(2):73-5.
37. Bathula SNP, Devani KP. Quantitative determination of amlodipine in human plasma by ultra-performance liquid chromatography- electro spray ionization mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *Asian J Pharm Clin Res.* 2012;5(1):89-93.
38. Liu Y, Jia J, Liu G, Li S, Lu C, Liu Y *et al.* Central Laboratory, Shanghai Xuhui Central Hospital, Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of two formulations of 10-mg amlodipine besylate: an open-label, single-dose, randomized, two-way crossover study in healthy chinese male volunteers. *Clin Ther.* 2009;31(4):777-83.
39. Günther H. La spectroscopie de RMN : Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie, Ed. Masson, Paris, 1994: p. 557.

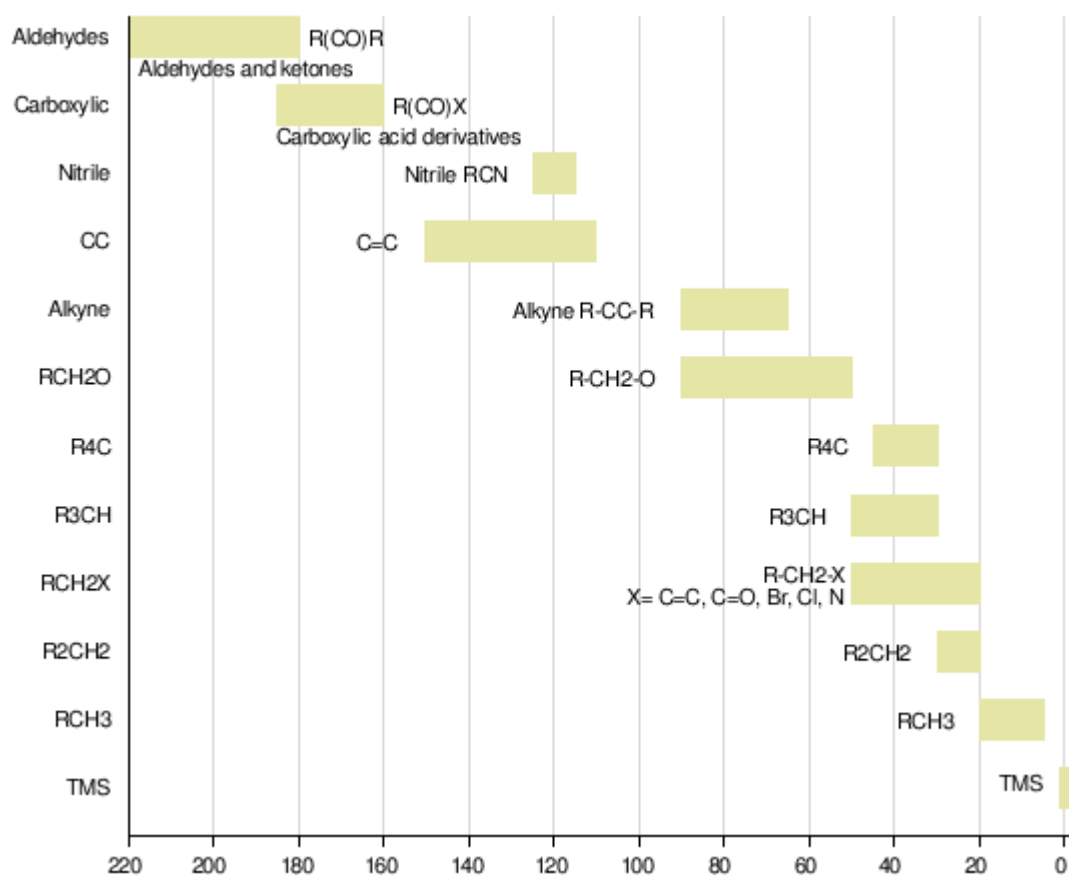
40. Yang C, Li Q, Liu X, Zhao X, Cui Y. ^1H and ^{13}C NMR Assignments for Amlodipine and Risperidone. *J Chinese Pharm Sci.* 2004;13(1):49-52.
41. Deepak S, Anurekha J and Alankar S. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and nebivolol hydrochloride in tablet dosage forms by reverse phase-high-performance liquid chromatographic using ultraviolet detection. *Pharm Methods.* 2011;2(1):9–14.
42. El-Gizawy SM, Abdelmageed OH, Omar MA, Deryea SM, Abdel-Megied AM. Development and Validation of CLHP Method for Simultaneous Determination of Amlodipine, Valsartan, Hydrochlorothiazide in Dosage Form and Spiked Human Plasma. *Am J Anal Chem.* 2012;3:422-30.
43. Sah R, Arora S. Development and validation of a CLHP analytical assay method for amlodipine besylate tablets: A potent Ca^{2+} channel blocker. *J Adv Pharm Edu Res.* 2012;2(3):93-100.
44. Alsarra IA. High-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of amlodipine in human plasma and pharmaceutical dosage form and its application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr Sci.* 2009;47:863-7.
45. Zarghi A, Foroutan SM, Shafaati A, Khoddam A. Validated CLHP method for determination of amlodipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Il Farmaco.* 2005;60:789-92.
46. Sirikatitham A, PanratK, Tanmanee N. Determination of amlodipine in human plasma by electrospray ionization LC-MS/MS method: validation and its stability studies. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2008;30(4):455-62.
47. Kaddar N, Pilote S, Wong S, Caillier B, Patoine D, Drolet B *et al.* Simultaneous Determination of Dofetilide and Amlodipine in Plasma by CLHP. *J Chromatograph Separat Techniq.* 2013;4(6):192-6.

48. Sevgi T, Sedef A. Determination of amlodipine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr B. 2001;758:305-10.
49. Ramananjanahary TD. Contrôle de qualité post-marketing de trois lots de Glinil[®] vendus à Antananarivo. Thèse de doctorat d'exercice en pharmacie, Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo, 2013 : 48 p.
50. Safeer K, Anbarasi B, Senthil NK. Analytical method development and validation of amlodipine and hydrochlorothiazide in combined dosage form by RP-CLHP. Int J ChemTech Res.2010;2(1):21-5.
51. Tengli AR, Gurupadayya BM, Soni N. Simultaneous estimation of hydrochlorothiazide, amlodipine, and losartan in tablet dosage form by RP-CLHP. IntJ Chem Anal Sci. 2013;4:33-8.

ANNEXES

Annexe 1: Table RMN ¹H[illegible]

Annexe 2: Table RMN ^{13}C



Annexe 3 : Groupe Générique AMLODIPINE (BESILATE DE)

	Amlodipine 10 mg
Référent(s)	AMLOR 10MG GELULE 30 AMLOR 10MG GELULE 90
Générique(s)	AMLODIPINE 10MG ACTAVIS FL GEL 30 AMLODIPINE 10MG ACTAVIS GELULE 30 AMLODIPINE 10MG ACTAVIS GELULE 90 AMLODIPINE 10MG ALMUS GELULE 30 AMLODIPINE 10MG ALMUS GELULE 90 AMLODIPINE 10MG ALTER GELULE 30 AMLODIPINE 10MG ALTER GELULE 90 AMLODIPINE 10MG ARROW GELULE 30 AMLODIPINE 10MG ARROW GELULE 90 AMLODIPINE 10MG BIOGARAN GELULE 30 AMLODIPINE 10MG BIOGARAN GELULE 90 AMLODIPINE 10MG BOUCHARA GELULE 30 AMLODIPINE 10MG BOUCHARA GELULE 90 AMLODIPINE 10MG CRISTERS GELULE 30 AMLODIPINE 10MG CRISTERS GELULE 90 AMLODIPINE 10MG EG GELULE 30 AMLODIPINE 10MG EG GELULE 90 AMLODIPINE 10MG EVOLUGEN GELULE 30 AMLODIPINE 10MG EVOLUGEN GELULE 90 AMLODIPINE 10MG ISOMED GELULE 30 AMLODIPINE 10MG ISOMED GELULE 90 AMLODIPINE 10MG MYLAN GELULE 30 AMLODIPINE 10MG MYLAN GELULE 90 AMLODIPINE 10MG MYLAN PIL GELULE30 AMLODIPINE 10MG PFIZER GELULE 30 AMLODIPINE 10MG PFIZER GELULE 90 AMLODIPINE 10MG PHR GELULE 30 AMLODIPINE 10MG PHR GELULE 90

	AMLODIPINE 10MG RANBAXY GELULE 30
	AMLODIPINE 10MG RANBAXY GELULE 90
	AMLODIPINE 10MG RATIO GELULE 30
	AMLODIPINE 10MG SANDOZ GELULE 30
	AMLODIPINE 10MG SANDOZ GELULE 90
	AMLODIPINE 10MG TEVA GELULE 30
	AMLODIPINE 10MG TEVA GELULE 90
	AMLODIPINE 10MG ZENTIVA GELULE 30
	AMLODIPINE 10MG ZENTIVA GELULE 90
	AMLODIPINE 10MG ZYDUS GELULE 30
	AMLODIPINE 10MG ZYDUS GELULE 90
	Amlodipine 5 mg
Référent(s)	AMLOR 5MG GELULE 30
	AMLOR 5MG GELULE 90
Générique(s)	AMLODIPINE 5MG ACTAVIS FL GEL 30
	AMLODIPINE 5MG ACTAVIS GELULE 30
	AMLODIPINE 5MG ACTAVIS GELULE 90
	AMLODIPINE 5MG ALMUS GELULE 30
	AMLODIPINE 5MG ALMUS GELULE 90
	AMLODIPINE 5MG ALTER GELULE 30
	AMLODIPINE 5MG ALTER GELULE 90
	AMLODIPINE 5MG ARROW GELULE 30
	AMLODIPINE 5MG ARROW GELULE 90
	AMLODIPINE 5MG BIOGARAN GELULE 30
	AMLODIPINE 5MG BIOGARAN GELULE 90
	AMLODIPINE 5MG BOUCHARA GELULE 30
	AMLODIPINE 5MG BOUCHARA GELULE 90
	AMLODIPINE 5MG CRISTERS GELULE 30
	AMLODIPINE 5MG CRISTERS GELULE 90
	AMLODIPINE 5MG EG GELULE 30

AMLODIPINE 5MG EG GELULE 90
AMLODIPINE 5MG EVOLUGEN GELULE 30
AMLODIPINE 5MG EVOLUGEN GELULE 90
AMLODIPINE 5MG ISOMED GELULE 30
AMLODIPINE 5MG ISOMED GELULE 90
AMLODIPINE 5MG MYLAN GELULE 30
AMLODIPINE 5MG MYLAN GELULE 90
AMLODIPINE 5MG MYLAN PIL GELULE30
AMLODIPINE 5MG PFIZER GELULE 30
AMLODIPINE 5MG PFIZER GELULE 90
AMLODIPINE 5MG PHR GELULE 30
AMLODIPINE 5MG PHR GELULE 90
AMLODIPINE 5MG RANBAXY GELULE 30
AMLODIPINE 5MG RANBAXY GELULE 90
AMLODIPINE 5MG RATIO GELULE 30
AMLODIPINE 5MG RATIO GELULE 90
AMLODIPINE 5MG SANDOZ GELULE 30
AMLODIPINE 5MG SANDOZ GELULE 90
AMLODIPINE 5MG TEVA GELULE 30
AMLODIPINE 5MG TEVA GELULE 90
AMLODIPINE 5MG ZENTIVA GELULE 30
AMLODIPINE 5MG ZENTIVA GELULE 90
AMLODIPINE 5MG ZYDUS GELULE 30
AMLODIPINE 5MG ZYDUS GELULE 90

Annexe 4 : Récapitulatif des temps de rétention lors de l'analyse des échantillons extraits de AMLOR et AMLOPRES en CLHP

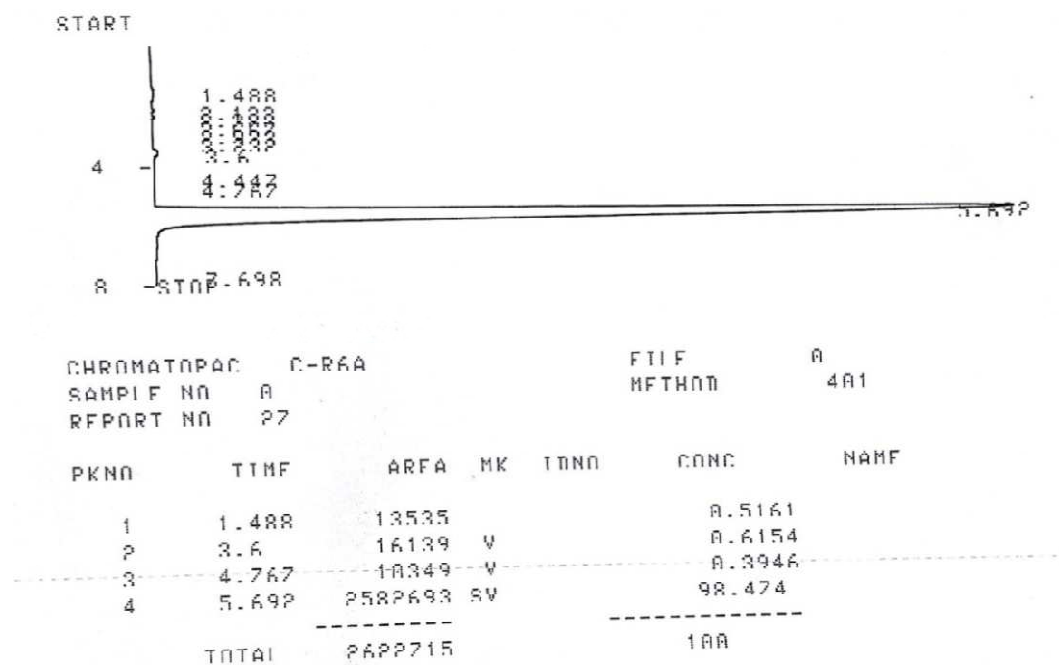
		Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6
TR (min)	Injection1	5,645	5,675	5,547	5,616	5,617	5,668
	Injection 2	5,677	5,692	5,567	5,638	5,641	5,672
	Injection 3	5,681	5,710	5,582	5,711	5,658	5,673
	Moyenne	5,668	5,692	5,565	5,642	5,639	5,671
Ecart-type		0,020	0,018	0,018	0,050	0,021	0,003
CV (%)		0,348	0,307	0,316	0,879	0,365	0,047

TR: Temps de rétention

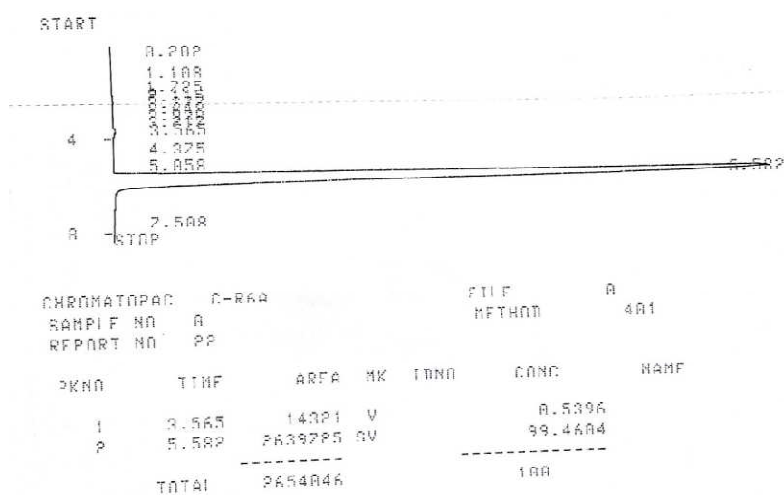
CV: Coefficient de variation

Annexe 5: Aspects de quelques chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des échantillons en CLHP

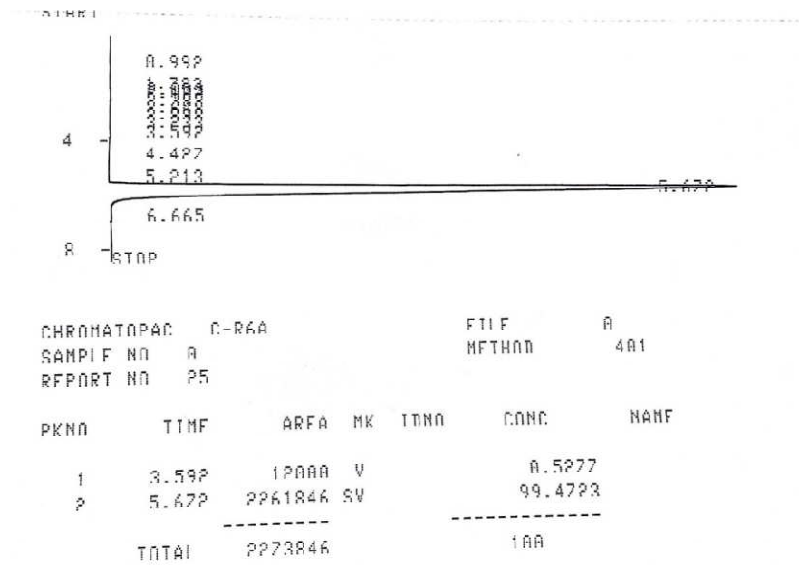
Analyse de l'échantillon 1:



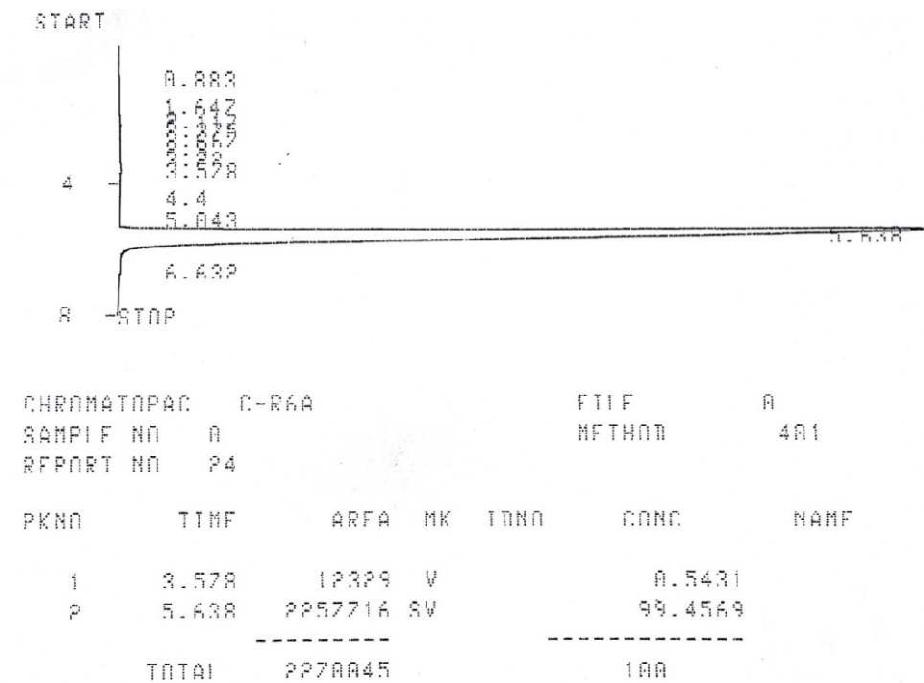
Analyse de l'échantillon 2:



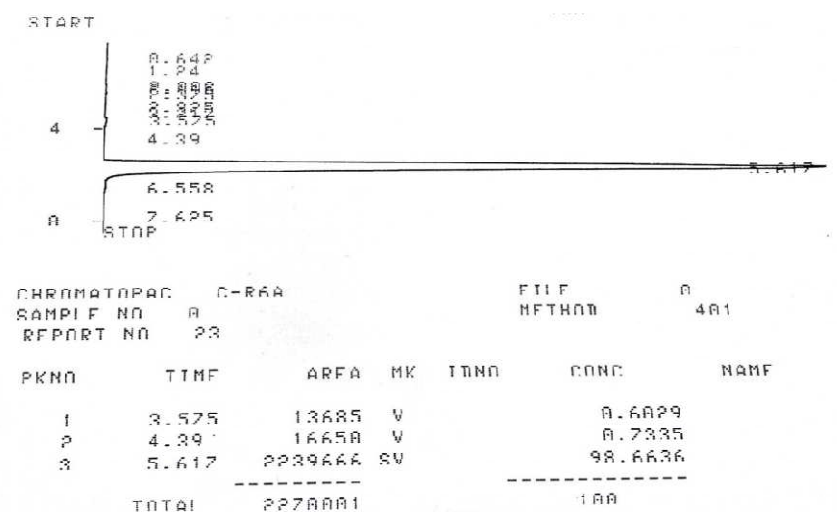
Analyse de l'échantillon 3:



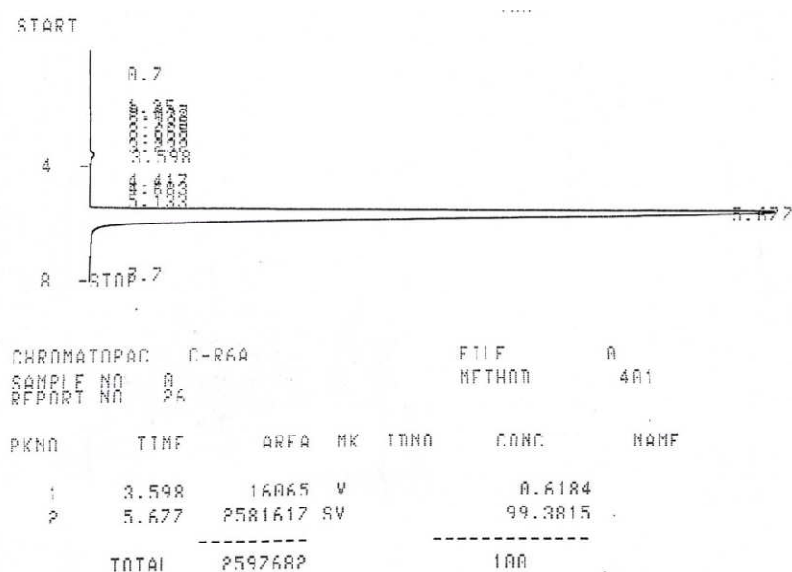
Analyse de l'échantillon 4 :



Analyse de l'échantillon 5 :



Analyse de l'échantillon 6 :



Annexe 6 : Résultats du dosage en PA des échantillons extraits d'AMLOR et AMLOPRES en CLHP

		Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Ech 5	Ech 6
Aire du pic	Injection1	2597682	2582693	2680311	2257716	2103104	2239666
	Injection 2	2582692	2649904	2689223	2194348	2107776	2257716
	Injection 3	2589679	2639724	2639725	2221145	2098872	2261846
	Moyenne	2590018	2623907	2669753	2224403	2103251	2253076
	Ecart-type	7500,74	36224,96	26384,02	31809,38	4453,81	11795,56
	CV (%)	0,29	1,38	0,99	1,43	0,21	0,52

Ech : Echantillon

CV : Coefficient de variation

Résultats lors de l'établissement de la gamme étalon pour le calcul du coefficient K au niveau des comprimés:

		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Concentration en PA (mg/ml)		0,312	0,625	1,25	2,5
Volume injecté(μl)		10	10	10	10
Aire du pic	Injection1	574077	1146332	1940600	3159994
	Injection 2	569703	1082404	2119140	3112352
	Injection 3	562258	1091341	1995548	-
	Moyenne	568679	1106692	2018548	3136352
	K	5,486.10 ⁻⁶	5,647.10 ⁻⁶	6,192.10 ⁻⁶	7,971.10 ⁻⁶

PA: Principe actif

K: Coefficient de variation

Annexe 7: Attestation du Laboratoire International Associé Antananarivo-Lyon1
Ampasapito



LABORATOIRE INTERNATIONAL ASSOCIE
UNIVERSITE ANTANANARIVO – UNIVERSITE LYON 1
Enceinte IST d'Antananarivo Ampasapito
Tel : + 261 34 17 524 64 Madagascar ou + 33 (0)4 72 43 14 07 France
voahangy.vestalys@yahoo.fr ou marc.lemaire@univ-lyon1.fr
Web : http://www2.univ-antananarivo.mg/lia/

A

Mme. SehenAndriamiasy
Doctorante en Pharmacie Université Antananarivo
+261 33 05 075 84
sehenandriamiasy@yahoo.fr

Par la présente nous certifions qu'il n'y a pas conflit d'intérêt
entre notre laboratoire d'analyse, le Laboratoire Internationale Associé
et les deux laboratoires exploitants les comprimés AMLORES et
AMLOPRES.

Fait a Antananarivo le 24 Juin 2015

Le Laboratoire International Associé

LABORATOIRE INTERNATIONAL ASSOCIE
Université d'Antananarivo
Université de Lyon

Prof Marc Lemaire

VELIRANO

Mianiana aho, eto anatrehan'ireo mpampianatra rehetra ato amin'ny sampampampianarana momba ny fahasalamana sy ny filan-kevitra ao amin'ny aro fenitrin'ny farmasianina ary ireo mpiara-mianatra amiko rehetra, fa :

- Hanome voninahitra ao anatin'ny fitsipika mifehy ny asako ireo rehetra namolavola sy nanofana ahy ary hahatsiaro mandrakariva ny soa lehibe nataon'izy ireo ka hitandro hatrany ny fampianarana nomeny ahy ;
- Hanatanteraka ny asako am-pahamendrehana sy am-pahamalinana ary ampahamarinana ka tsy hanararaotra na hitady tombony mihoatran'izay lazain'ny lalàna ary hanaja an-tsakany sy an-davany ny lalàna rehetra manankery mifehy izany mba ho tombon-tsoa ambonin'ny fahasalamam-bahoaka ;
- Tsy hanadino mihitsy ny adidy aman'andraikitra amin'ireo marary sy ny hasin'ny maha-olona ;
- Tsy hanaiky mihitsy hampiasa ny fahalalako sy ny fahefako mba ho fitaovana handikana ny maha-olona sy hanatanterahana heloka famonoana olona na amin'inona na amin'inona ary na rahoviana na rahoviana.

Enga anie mba ho hajain'ny mpiara-monina aho raha manaja an-tsakany sy andavany izao ianianako izao, fa kosa ho feno henatra sy ho halan'ireo mpiara-miasa raha tsy manaja izany.

PERMIS D'IMPRIMER

LU ET APPROUVE

Le Directeur de Thèse

Signé : **Professeur RAZAFIMAHEFA RAMILISON Dorothée**

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Doyen de la Faculté de Médecine d'Antananarivo

Signé: **Professeur ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana**

Name and first name : ANDRIAMIASY Sehen

Title of Thesis : EXTRACTION AND CHEMICAL CHARACTERIZATION
OF AMLODIPINE FOR COMPARATIVE ANALYSIS OF
AMLOPRES[®] AND AMLOR[®] FORMULATIONS

Heading: Analytical Chemistry

Number of pages: 64 **Number of tables:** 17 **Number of pictures:** 21

Number of appendices: 07 **Number of bibliographic references:** 51

SUMMARY

Introduction: The lack of the reference substance of amlodipine in Madagascar is a barrier for the quality control of the drugs containing this molecule and their bio-equivalence assessment. This study aims to compare three batches of AMLOPRES[®] to their corresponding princeps AMLOR[®], using a method of extraction of amlodipine from tablets of AMLO DENK[®].

Methods: The identification of the extracted product was performed by thin layer chromatography, mass spectrometry and proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. The extract was then used to compare the active principle level in these drugs using an electronic precision scale and a high performance liquid chromatography method.

Results: The thin layer chromatography and the high performance liquid chromatography methods proved the purity of the product. The mass spectra and the nuclear magnetic resonance spectra allow us to identify the extracted product as amlodipine. The tablets of AMLOPRES[®] are under-dosed compared to AMLOR[®] tablet (21.04 mg versus 25.02 mg) and have a greater intra-batch variation (CV = 3.12%).

Conclusion: These observations would warn pharmacists on the substitution of the AMLOR[®] by generic drugs. This study allowed us to know an extracting method to obtain pure amlodipine. It could be used for other dihydropyridine containing drugs.

Key-words: amlodipine, extraction, identification, dosage, substitution

Thesis director : Professor RAZAFIMAHEFA RAMILISON Dorothée

Thesis reporter : Doctor RAMANITRAHASIMBOLA David

Author's Address : Lot II P 73 Bis Avaradoha Antananarivo

Nom et prénoms : ANDRIAMIASY Sehen

Titre de la thèse : EXTRACTION ET CARACTERISATION CHIMIQUE DE
L'AMLODIPINE EN VUE D'UNE ETUDE COMPARATIVE
D'AMLOPRES[®] ET AMLOR[®]

Rubrique : Chimie Analytique

Nombre de pages : 64 **Nombre de tableaux** : 17 **Nombre de figures** : 21

Nombre d'annexes : 07 **Nombre de références bibliographiques** : 51

RESUME

Introduction : L'absence du produit de référence de l'amlodipine à Madagascar constitue un obstacle pour le contrôle de la qualité et la réalisation des études de bioéquivalence des médicaments à base de cette molécule. Cette étude vise à comparer trois lots d'AMLOPRES[®] au princeps AMLOR[®] en expérimentant une méthode d'extraction de l'amlodipine à partir de comprimés d'AMLO DENK[®].

Méthodes : L'identification du produit extrait a été réalisée par chromatographie sur couche mince, spectrométrie de masse et spectrométrie de résonance magnétique nucléaire de proton et de carbone-13. Le produit a ensuite servi à comparer la teneur en principe actif de ces médicaments à la balance de précision et en chromatographie liquide à haute performance.

Résultats : Les spectres de masse et de résonance magnétique nucléaire ont révélé que l'extrait obtenu correspond à l'amlodipine. La chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide à haute performance ont démontré la pureté de la substance. Les comprimés d'AMLOPRES[®] sont sous-dosés par rapport à AMLOR[®] (21,04 mg contre 25,02mg) et présentent une plus grande variation intra-lot (CV=3,12%).

Conclusion : Ces constats devraient mettre en garde la substitution de la spécialité en génériques par les pharmaciens. Cette étude nous a permis de connaître une méthode d'extraction de la molécule d'amlodipine à l'état pur. Elle pourrait être appliquée pour les autres molécules de dihydropyridines.

Mots clés : amlodipine, extraction, identification, dosage, substitution

Directeur de thèse : Professeur RAZAFIMAHEFA RAMILISON Dorothee

Rapporteur de thèse : Docteur RAMANITRAHASIMBOLA David

Adresse de l'auteur : Lot II P 73 Bis Avaradoha Antananarivo