Année Universitaire : 2009-2010

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Recherche des métaux lourds dans les substances médicamenteuses

Présenté par:

M'RABET ouiçal

Encadré par:

- Mr :M.AZOUGAGH (LNCM rabat)
- Mr :Y.ELBEKKAYE (LNCM rabat)
-Mr :A.OULMEKKI (FST FES)

Soutenu Le 24 Juin 2010 devant le jury composé de:

- **Mr : M.AZOUGAGH (LNCM rabat)**
- **Mr : J.E. HAZM (FST FES)**
- **Mr : F.KHALIL (FST FES)**
- **Mr : Kh. SKALI (FST FES)**
- **Mr : A.OULMEKKI (FST FES)**

Stage effectué au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

M'RABET ouiçal

Année Universitaire : 2009/2010

Titre: Recherche des métaux lourds dans des substances médicamenteuses

Résumé

Les métaux lourds sont des impuretés inorganiques toxiques qui existent dans notre environnement.les efforts sont orientés pour minimiser les taux de ces impuretés dans tous les domaines : santé, environnement, alimentation…. le médicament est le produit le plus contrôlé.

Sept procédés différents (A-B-C-D-E-F-G), tous de la pharmacopée européenne peuvent être appliqués. Seuls les procédés A, B et C qui sont largement cités dans les monographies des substances.

Dans notre travail nous avons appliqué les Procédés A et B sur différentes matières première. La spectrophotométrie **UV-Vis** peut donner plus d'efficacité pour le test des métaux lourds car elle assure une meilleure traçabilité et une décision sans doute.

Mots clés:

Métaux lourds, pharmacopée européenne, essais limites, solution examinée, solution témoin, solution control, solution blanc, filtration, spectrophotométrie.

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut…
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance…
Aussi, c'est tout simplement que…
Je dédie ce mémoire à …

A mes parents,

En reconnaissance des sacrifices qu'ils ont toujours consentis pour moi, de leurs encouragements, leur soutien, et de leur aide morale et matérielle permanente. Que ce modeste travail soit pour eux un témoignage de mon infini respect et mon profond amour.

A mes frères et ma sœur,

Avec tout l'amour que je leur porte en témoignage de l'affection que je leur ai toujours réservé, j'espère qu'ils trouvent à travers ce travail l'expression de mes sentiments les plus chaleureux.

A ma famille,

Aucune dédicace ne saurait vous exprimer mon grand attachement, vous trouverez ici la reconnaissance pour tous les services que vous avez pu me rendre.

A wiame

Ma chère cousine qui m'a logée, encouragée, et supportée toute la période de stage

A mon ange *LINA*

A l'âme de Mr: ELHAWZI Mohammed ingénieur d'informatique au laboratoire

A tous ceux qui me sont chers.

REMERCIEMENTS

Monsieur ELOUAZANI FOUAD responsable de master Chimie des Molécules Bioactives
Pour m'avoir donné l'occasion de s'inscrire au master, et pour son aide précieux tout au long de la période d'étude.

Monsieur OULMEKKI AHMED Professeur à la faculté des sciences et techniques Fès
Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de diriger ce travail.

Vous m'avez guidé et orienté avec sympathie et bienveillance malgré vos préoccupations et vos responsabilités.

Permettez-moi de vous exprimer ma haute Considération, mon respect et mes vifs remerciements

Monsieur MOHAMMED AZOUGAGH responsable de service Physico-chimique au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments
Mon encadrant de stage pour ses grandes qualités professionnelles et humaines. Pour vous encouragements, votre aide et vous conseils tout au long de ma formation.

En témoignage de mon grand respect et ma profonde considération.

Monsieur YOUSFI EL BEKKAYE docteur en chimie au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments
Mon Co-encadrant de stage, aucune expression ne pourra suffire ou refléter ma reconnaissance et ma gratitude pour tous les efforts que vous avez fait pour moi.

Je tiens à vous exprimer mes vifs remerciements.

Messieurs : J.E.HAZM, F .KHALIL, KH.SKALI professeurs à la Faculté des Sciences et Techniques Fès

Les membres de juré qui ont acceptés de jugé mon travail et pour leurs remarques remarquables.

Messieurs : TAHR, NOURDINE, YOUSEF, MILOUD, BENLFILALI, RADI, TALBI, KHALID, YOUNESS, ABD ELKADER, RACHID, MUSTAPHA, MAZIAN et Mme SAADIYA

Pour leurs aide précieux et leurs formations toute la période de mon stage au sein du service, veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude de mon profond respect.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS 8
INTRODUCTION 9
I- PRESENTATION DE LA DIRECTION DU MEDICAMENT ET DE LA PHARMACIE 10
A- DIVISION DE LA PHARMACIE 11
B- DIVISION DU LABORATOIRE NATIONAL DE CONTROLE DES MEDICAMENTS 11
I : GENERALITES SUR LES METAUX 16
II. LES METAUX LOURDS DANS LES MEDICAMENTS 20
1. DEFINITION DU MEDICAMENT 20
2. COMPOSITION D'UN MEDICAMENT 20
3. LES IMPURETES 21
4. EVALUATION DU RISQUE DES METAUX 24
III. METHODES DE CONTROLE DES METAUX LOURDS DANS LES PRODUITS 24
PHARMACEUTIQUES 24
1. METHODES SPECIFIQUES POUR LA RECHERCHE DES METAUX LOURDS 25
2. PRINCIPE DE LA METHODE « TEST DES METAUX LOURDS » 25
IV. LES PROCEDES DE LA PHARMACOPEE POUR LE TEST DES METAUX 29
LOURDS 29
1. DEFINITION DE LA PHARMACOPEE 29
I. MATERIELS ET METHODES 32
1. L'ECHANTILLONNAGE 32
2. OUTIL UTILISE 32
3. PRESENTATION DES PROCEDES DE LA PHARMACOPEE EUROPEENNE 35
4. PREPARATION DES REACTIFS 37
5. PRESENTATION DES PROCEDES A ET B 39
II. METHODE D'INTERPRETATION DES RESULTATS 42
1. VERIFICATION DE CONFORMITE DU TEST 42
2. DECISION 42
3. VERIFICATION DE L'EFFICACITE DE LA SPECTROPHOTOMETRIE ET STABILITE DU 43
REACTIF THIOACETAMIDE 43
4. TEST DES METAUX LOURDS SUR DES MATIERES PREMIERES MEDICAMENTEUSE 47
4.1. MATIERE PREMIERE ANALYSE SELON PROCEDES A 47
4.2. MATIERE PREMIERE ANALYSEE SELON PROCEDE B 54
RECOMMANDATIONS 60
CONCLUSION GENERALE 61

Liste des Abréviations

AMM : Autorisation de mise sur le marché
AQT : Apport quotidien tolérable
CM : Code du médicament et de la pharmacie
DCI : Dénomination commune internationale
DJA : Dose journalière admissible
EDQM : European Directorial for the quality of medicines and healthcares.
EJA : Injection journalière admissible
EMEA : Agence européenne d'évaluation des produits médicamenteux
ETM : Eléments en traces métalliques
FB1 : Fabricant numéreau 1
FB2 : Fabricant numéreau 2
FB3 : Fabricant numéreau 3
ICH : International conférence on harmonisation
ISO : International standard organisation
LNCM : laboratoire National de contrôle des médicaments
MP : Matière première
M-S : Métal sulfite
OMCL : Organisation mondiale des laboratoires de contrôle du médicament
OMS : Organisation mondiale de la santé
Ph Eu : Pharmacopée européenne
PISC : Programme international sur la sécurité des substances chimiques
ppb : Partie par billion
ppm : Partie par million
USP : United state pharmacopeia
UV/VIS : Ultraviolet/visible

Introduction

A nos jours, la démarche qualité est devenue une priorité dans tous les domaines d'activité. Le domaine de la santé publique n'échappe pas à cette évolution. Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments Marocain (LNCM) prend toutes les mesures de contrôle pour que l'efficacité et la sécurité des médicaments soient acceptables.

Le LNCM est l'autorité compétente au Maroc chargé d'assurer le contrôle de la qualité des médicaments locaux ou importés. Le contrôle se fait selon des protocoles internationaux en vigueur (Ph Eu, USP…) avec la rigueur exigée par les normes des bonnes pratiques du laboratoire. De plus l'amélioration, l'efficacité des tests d'expertise est parmi les objectifs visés pour assurer un médicament parfaitement contrôlé.

Le médicament est un produit essentiel (efficace) dans le traitement préventif ou curatif des maladies. Il peut contenir parmi ses éléments constituants (principe actif + excipients) des substances qui peuvent altérer son efficacité et augmenter ses effets indésirables, parmi les quelles les impuretés et plus spécialement les métaux lourds. Ces impuretés présentent un danger remarquable pour la santé.

Donc quelles sont les procédures utilisées pour l'optimisation et la recherche des métaux lourds dans la matière première médicamenteuse selon la pharmacopée européenne ?

Le présent travail rassemble trois chapitres essentiels :

- Le premier chapitre présente l'organigramme de laboratoire national du contrôle de médicament
- Le deuxième chapitre présente la partie documentaire dans laquelle nous avons effectué une étude descriptive sur les métaux lourds, leurs toxicités et normes qui gèrent leurs teneurs dans les médicaments. Nous avons mis le point sur la problématique qui englobe la définition et la liste des métaux lourds également.
- Le troisième chapitre présente la partie pratique analytique dans laquelle nous avons réalisé une étude approfondie sur les procédés de la pharmacopée européenne pour la recherche des métaux lourds.

Chapitre I

Présentation du laboratoire National de Contrôle Des Médicaments

I- Présentation de la Direction du Médicament et de la Pharmacie

La direction du médicament et de la pharmacie a été crée en 1969 par Décret n°2172-373 du 24 avril 1974 qui fixe ses prérogatives. LNCM est une division de la DMP, elle est Inscrite sur la liste des laboratoires officiels de l'OMS. Le Laboratoire national de contrôle des médicaments est un Membre observateur de la Pharmacopée Européenne, Membre du réseau des laboratoires nationaux européens du contrôle des médicaments, puis accrédité par le réseau EDQM (Direction Européenne de Qualité des Médicaments) depuis 2007.

La direction est composée de deux divisions : -division de la pharmacie
-division du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (L N C M).

A- Division de la pharmacie

Elle Fixe le cadre des prix des médicaments et des spécialités pharmaceutiques, Assure le contrôle technique et de qualité dans le cadre de la législation et de la réglementation en vigueur en se basant sur les résultats des expertises analytiques et documentaires fournis par le LNCM, elle Etablit et met à jour la liste des médicaments essentiels et assure le contrôle de qualité, Coordonne, anime, encadre, et évalue l'activité, Veille à la formation continue des cadres et agents de la division, et assure le suivi des relations de la division.

B- Division du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments

1-Missions

- Expertise et contrôle analytique des médicaments (matière première et produit fini), des dispositifs médicaux et de tout autre article destiné à l'usage de la médicine humaine.
- Evaluation de la documentation chimique, biologique et pharmaceutique des produits pharmaceutiques.

2- Ressources humaines

Selon une enquête : 18 pharmaciens, 38 docteurs scientifiques, 5 ingénieurs, 20 préparateurs en pharmacie, 4 techniciens de laboratoires, 3 secrétaires et 5 agents de service.

3-Structure

Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) abrite quatre services et cinq unités qui sont :

- **Service Assurance Qualité**
- **Service de Normalisation et Dispositifs Médicaux**
- **Service des Essais Biologiques**
- **Service Physico-chimique**
- **Unité de Management Qualité**
- **Unité Métrologie**
- **Unité de réserve**
- **Unité d'Informatique**
- **Unité de Sécurité**

4-Organigramme de la division du LNCM

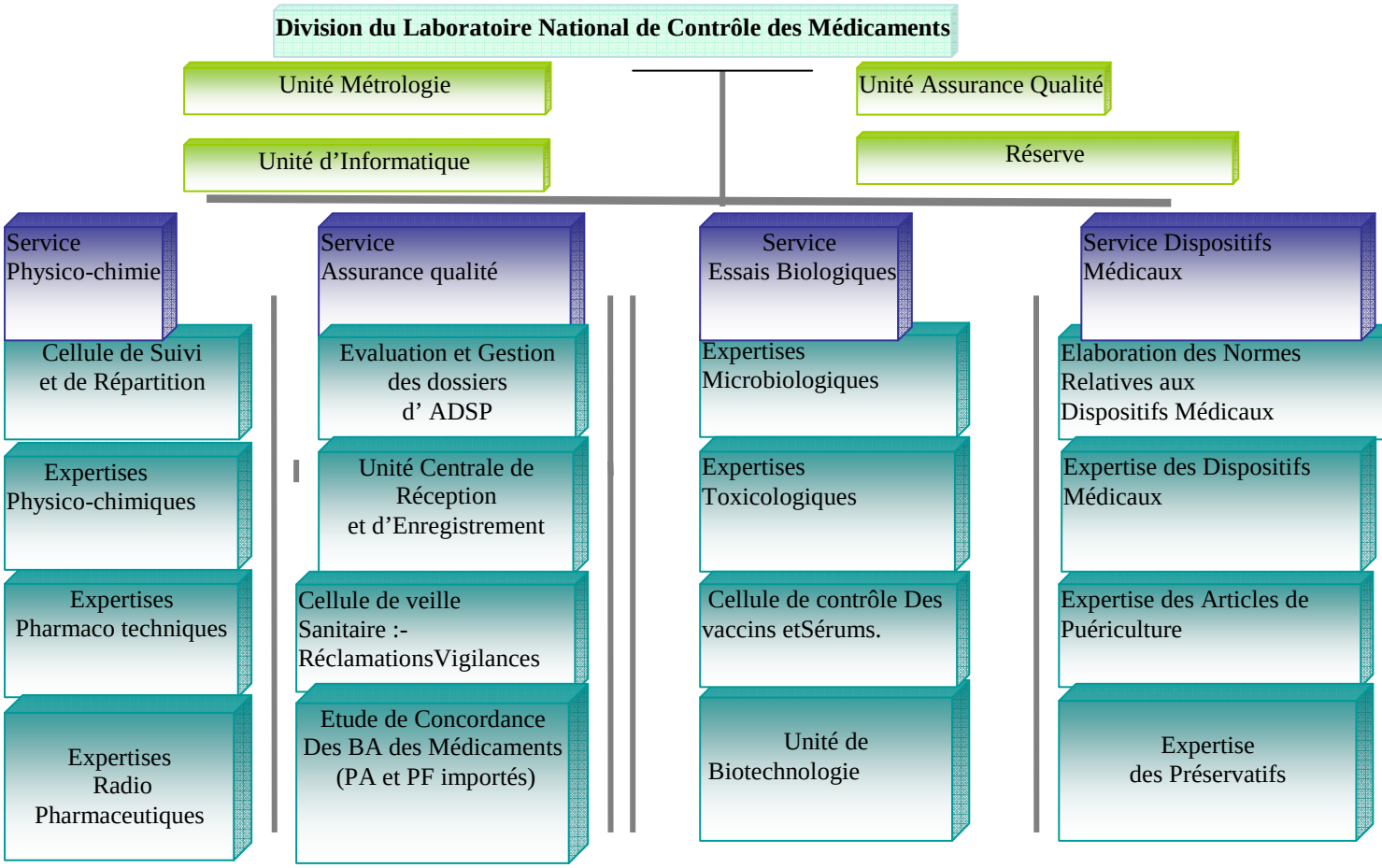


Figure 1 : Organigramme de la direction des médicaments et de la pharmacie

4-1 : Service physico-chimique

4-1-1 : Mission

Il a pour mission le contrôle documentaire et surtout analytique des spécialités pharmaceutiques (matières premières, produits finis et conditionnement.

4-1-2 : Activités

- Exécution des essais physico-chimiques et des tests galéniques et le contrôle par rapport aux normes de qualité avec l'objectif de fournir une base scientifique à toute décision d'ordre technique, administratif ou juridique.

-Formulation des résultats des tests dans des procès verbaux, analyse des anomalies constatées et formulation des recommandations concernant les suites à donner.

4-1-3 : Organigramme du service physico-chimique

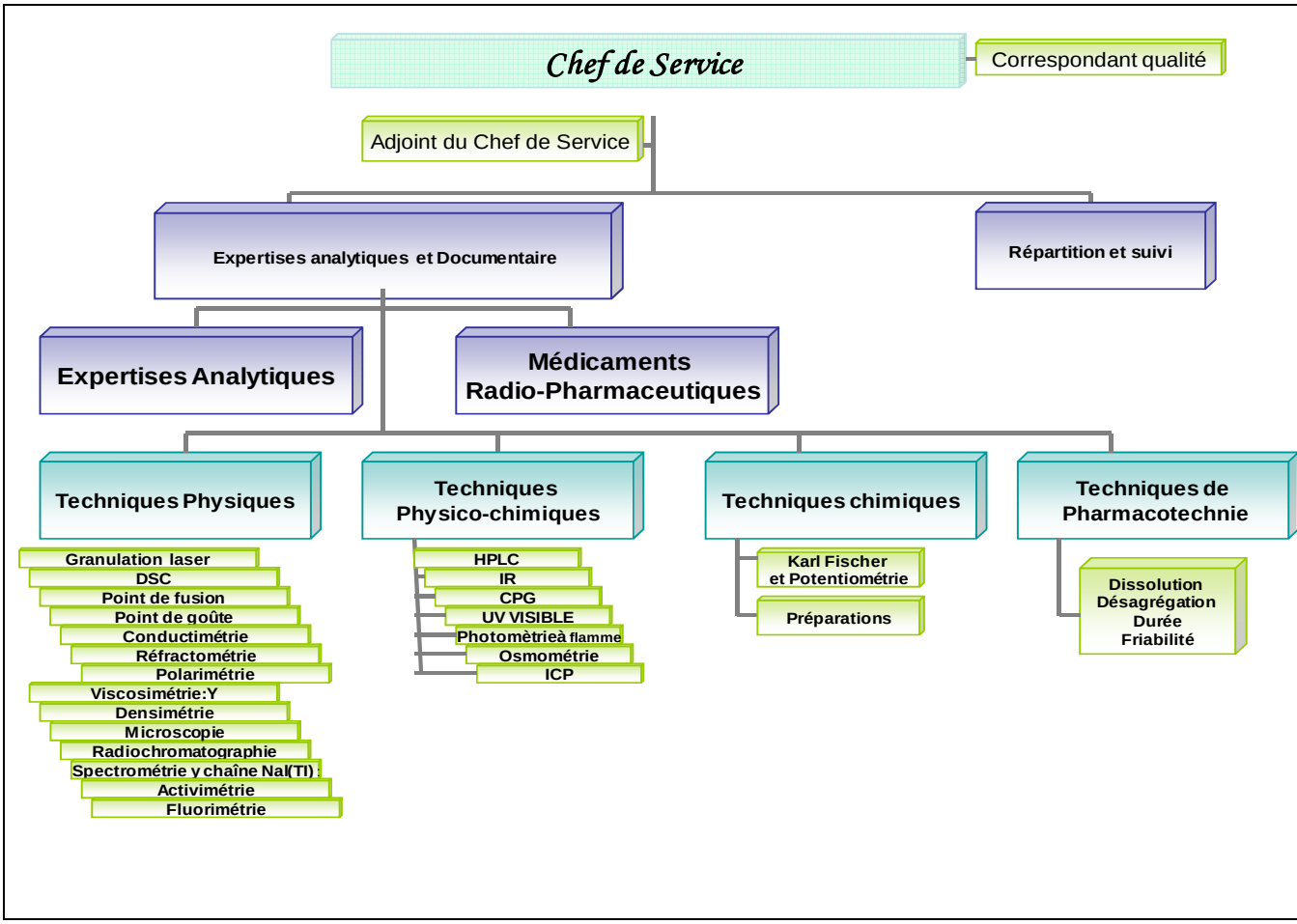


Figure 2*:* Organigramme de laboratoire National de Contrôle des médicaments et de la pharmacie

4-1-4 : Référentiels de travail au sein du laboratoire

Pharmacopée européenne (principalement), USP, BP (british Pharmacopée) , guidelines ICH, directives européennes et de l'OMS, et circulaires du ministère de la Santé.

4-1-5 : Les principaux tests réalisés par le service physico-chimique

Les tests physico-chimiques utilisés pour vérifier la qualité des médicaments (matières premières et produits finis) sont :

a-Tests d'identification

Les tests d'identification appelés aussi des analyses qualitatives servent à vérifier l'identité de la substance analysée dans un échantillon. Ils consistent normalement à vérifier une caractéristique de l'échantillon (p. ex. ses propriétés spectrales, ses caractères chromatographiques, sa réaction chimique, etc.) avec celle d'un étalon de référence.

b-Tests de dosage et de pureté (physique, chimique, isométrique)

Le dosage est la détermination avec exactitude de la teneur de principe actif. La méthode utilisée doit montrer une justesse et une fidélité pour détecter les faibles teneurs d'impureté

c- tests galéniques

Pour vérifier la qualité de produit fini des tests galéniques sont effectués

*dissolution
*désagrégation
*dureté
*friabilité

Chapitre II

Partie Bibliographique

I : Généralités sur les Métaux

1-Définition

Par définition un métal est une matière naturelle, le plus souvent, son origine est un minerai.

Il possède des caractéristiques particulières :

- Il est doté d'un éclat particulier.
- C'est un bon conducteur de chaleur et d'électricité,
- Il possède des caractéristiques de dureté et de malléabilité,
- En contact avec les acides donne un sel, et en contact avec l'oxygène donne un oxyde excepté les métaux nobles
- Il se combine ainsi aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisables dans l'industrie,
- Il se transporte, change de forme chimique, mais ne se détruit pas.

En chimie, dans le classement périodique on distingue trois familles essentielles :

*Les métaux qui constituent la plupart des éléments chimiques

*Les métalloïdes

*Les non métaux

En effet, les métaux lourds ne sont pas tous des métaux, de plus les métaux ne sont pas tous classés dans les métaux lourds.

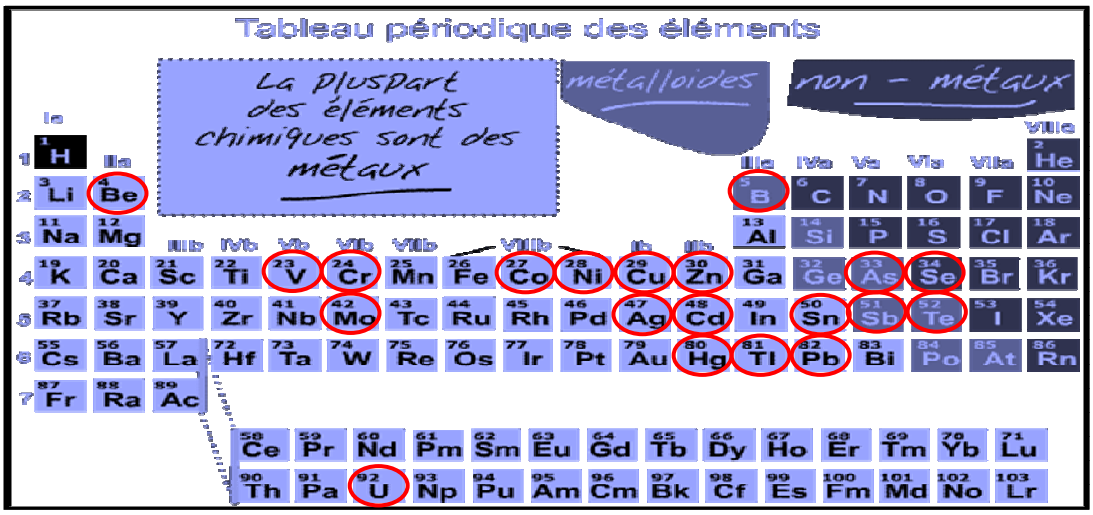


Figure 3 : les éléments chimiques connus comme métal

Légende :

⋆ *:* Un métalloïde est un élément qui combine certaines caractéristiques du métal et d'autres Caractéristiques opposées, l'absence de conductivité électrique par exemple. L'arsenic est un métalloïde.

** : Le cercle indique les éléments cités comme toxiques pour l'homme et l'environnement dans divers documents)

2. Problème d'appellation « Les métaux lourds »

Dans un grand nombre de références, les métaux lourds sont les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 g/cm3. On retrouve dans certaines publications anciennes l'appellation de « métal pesant ». Selon P.Ragho dans « inorganic impureties-heavy metals industry perspective 2008 », 41 éléments correspondent à cette définition générale auxquels il faut ajouter cinq métalloïdes voir figure 3.
Cependant cette appellation suscite une grande discussion entre les auteurs car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » comme le zinc. En contre partie, certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux comme l'arsenic par exemple. Cette problématique est décrite dans le rapport de Sénat français. Par cette citation : « L'appellation métaux lourds est cependant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique » [(2)].

3. Appellation « ETM : éléments en traces métalliques»

Les métaux lourds existent dans l'air, l'eau et le sol, mais en général en quantités très faibles. On dit que les métaux sont présents « en traces ». Ils sont aussi « la trace » du passé géologique et de l'activité de l'homme. Pour cette raison, la plupart des scientifiques confèrent aux métaux lourds, l'appellation « éléments en traces métalliques » -ETM- ou par extension « éléments traces ». Cette dernière appellation semble être plus proche à une appellation juste. Mais elle n'est pas encore adoptée, et l'appellation métaux lourds reste la plus connue.

4. Problème de la liste des métaux lourds

A cause de l'absence d'une définition scientifique des métaux lourds, les autorités réglementaires se sont trouvées dans une difficulté pour définir une liste unique pour les métaux à effet néfaste sur l'environnement et l'homme. : 7, 9, 10, 12 ou 15 métaux? Dans son rapport sur les éléments en France, l'Académie des Sciences ne prend en considération que neuf éléments, classés en « éléments en traces ». En conclusion, « La réglementation n'est donc d'aucun secours et contribue même à entretenir l'ambiguïté » citation tirée du rapport de Sénat français.

Dans le domaine pharmaceutique, entre la pharmacopée européenne et américaine à ce niveau encore nous ne trouvons pas un accord. Pour illustrer cette différence, le tableau suivant donne les éléments classés en traces métalliques dans la **Ph Eu** et l'**USP.**[(1)]

Spécification *USP* + *Ph. Eu* **Ph EU spécification**						
	NOM	**Symb.**		**NOM**	**Symb.**	**Limites**
1	Plomb	Pb	6	Etain	Sn	Max 20 ppm
2	Mercure	Hg	7	Cadmium	Cd	
3	Bismuth	Bi	8	Argent	Ag	
4	Arsenic	As	9	Cuivre	Cu	
5	Antimoine	Sb	10	Molybdène	Mo	
11	Vanadium	V	Max 20 ppm			
12	Palladium	Pd				
13	Platine	Pt				
14	Or	Au				
15	Ruthénium	Ru				

Tableau 1 : Liste des métaux lourds selon la monographie [(1)]

5. Toxicité des métaux lourds

Aujourd'hui les métaux lourds sont présents dans notre alimentation quotidienne. Il devient très difficile d'éviter l'exposition à ces éléments si répandus dans notre environnement. Il est connu que

les métaux à des concentrations bien définies sont des oligo-éléments indispensables à la vie comme le fer, le cuivre, le nickel, le chrome....D'une manière générale, l'empoisonnement par les métaux lourds se traduit par le phénomène de la bioaccumulation. Par définition, ledit phénomène est le processus d'assimilation et de concentration des métaux lourds dans l'organisme.

La bioaccumulation est un processus par lequel un organisme vivant absorbe une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il la rejette V (entrées) > V (sorties)

6. Toxicité chronique ou Aigue

En règle générale, la toxicité aigue est généralement rare. Par contre la toxicité chronique peut avoir lieu en donnant des syndromes ambiguës comme : le mal de tête, la fatigue, pâleur, vertige, manque de concentration, troubles digestifs, constipation,…. Souvent ces syndromes sont mal diagnostiqués et entraînent une maladie chronique par fois silencieuse.

D'une manière résumée on peut citer les principaux dangers des métaux lourds sur la santé dans les points suivants:

-Ils remplacent ou substituent les minéraux essentiels dans le corps et perturbent le fonctionnement des biomolécules.

-Ils ont un effet antibiotique, ce qui augmente la résistance des bactéries.

-Ils changent notre code génétique.

-Ils produisent des radicaux libres.

-Ils neutralisent les acides aminés utilisés pour la détoxication.

-Ils causent des allergies.

-Ils endommagent les cellules nerveuses.

-Ils causent des problèmes neuro-dégénératifs (Parkinson, Alzheimer)

-Ils causent des lésions organiques et la maladie cancéreuse

II. Les métaux lourds dans les médicaments

1. Définition du médicament

°l'Organisation mondiale de la santé (OMS) définie :

Le médicament est toute substance à but thérapeutique, prophylaxie, ou diagnostic, destinée à modifier les fonctions physiologiques et présentée sous une posologie permettant son administration à l'homme.

°le Dahir portant loi n°1-76-432 de février 1977, B.o n°3369, ainsi que l'article L511 du code de la santé publique définissent le médicament:

« On entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ».(4)

2. Composition d'un médicament

Le médicament est constitué d'une (ou plusieurs) substances actives et de substances d'emballage (les excipients) qui vont conférer à la drogue finale des qualités de stabilité, forme, dissolution, ciblage, goût, couleur, esthétique, etc.(1)

2.1. Substance active compatibilité

D'un point de vue pharmaceutique, la substance active (autrefois : principe actif) est celle qui dans un médicament possède un effet thérapeutique. Cette substance est, la plupart du temps, en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients. Ça peut être une substance pure chimiquement définie (abusivement qualifiée de molécule) ou un mélange de plusieurs substances chimiquement proches (isomères, par exemple) ou encore une substance définie par son mode d'obtention.

2.2. Excipients

Un excipient désigne toute substance autre que le principe actif dans un médicament, un cosmétique ou un aliment. Son addition est destinée à conférer une consistance donnée, ou d'autres caractéristiques physiques ou gustatives particulières, au produit final, tout en évitant toute interaction, particulièrement chimique avec le principe actif.

3. les Impuretés

3.1. Définition

Par définition, les impuretés sont des substances étrangères qui existent, même en faibles quantités, dans une autre substance ou un mélange étudié et qui l'altèrent.

La présence des impuretés dans les substances médicamenteuses n'altère pas seulement la stabilité du médicament mais aussi peut avoir une toxicité.

Quand il s'agit d'une impureté très toxique, les normes tolérées sont très strictes de l'ordre de ppm ou de ppb comme les métaux lourds et les solvants résiduels et les impuretés génotoxiques. Dans le cas contraire les normes sont peu serrées.

Les impuretés présentent dans les substances médicamenteuses sont traitées sous deux angles différents:

a. L'aspect chimique

Comprenant la classification et la caractérisation des impuretés, la production de rapports, l'énumération des impuretés dans les spécifications et un bref exposé des méthodes d'analyse.

b. L'aspect de l'innocuité

Des études générales de toxicité sont souhaitables, elles devraient être conçues de façon à permettre la comparaison entre la substance qualifiée et la substance non qualifiée. La durée de l'étude devrait être choisie en fonction de données pertinentes et l'étude devrait être réalisée sur l'espèce la plus susceptible de permettre la mise en évidence de la toxicité de l'impureté. Selon chaque cas, une

étude à dose unique peut suffire, surtout pour les médicaments à dose unique. En général, une durée minimum de 14 jours et maximum de 90 jours sont acceptables.

3.2. Classification des impuretés

Les impuretés dans les substances médicamenteuses, les excipients et les produits finis sont classés dans ICH Q3A selon les catégories suivantes. [5]

- Les impuretés organiques qui sont dues à la dégradation de la substance active ou proviennent de la synthèse. On parle donc des impuretés de synthèse et de dégradation
- Les solvants résiduels ou encore les impuretés organiques volatiles
- Les impuretés inorganiques qui comportent les métaux lourds, la cendre sulfurique et l'eau

3.2.1. Les impuretés organiques

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

°Les produits de base.

°Les sous-produits.

°Les intermédiaires.

°Les produits de dégradation.

°Les réactifs et les ligands.

D'une manière générale les normes tolérées pour ces impuretés sont de quelque % ou quelques ppm selon la toxicité des ces impuretés.

3.2.2. Les solvants résiduels

Les solvants résiduels sont dans la plupart des cas des liquides organiques ou par fois inorganiques utilisés généralement dans la dernière étape de purification ou recristallisation de la substance active.

Les normes tolérées pour ces impuretés sont de quelques ppm selon la classe du solvant.

3.2.3. Les impuretés inorganiques

Les impuretés inorganiques peuvent provenir des produits de base, des canalisations et des réacteurs et des catalyseurs. Généralement, elles sont connues et identifiées et comprennent:

Les réactifs, les ligands et les catalyseurs; les métaux lourds et autres métaux résiduels; les sels inorganiques.

Les normes tolérées pour ces impuretés sont de quelques ppm et dépondent de la classe du métal et le mode d'administration du médicament. Le tableau suivant donne les normes des métaux résiduels tolérés par EMEA.[3]

Classification	Administration Orale		Administration Parental	
	EJA (µg/day)	**Conc (ppm)**	**EJA (µg/day)**	**Conc (ppm)**
Classe-1A Platine (Pt) Palladium (Pd)	**100**	**10**	**10**	**1**
Classe-1B Iridium (Ir) rhodium (Rd) ruthénium (Ru) osmium (Os)	**100**	**10**	**10**	**1**
Classe-1C Molybdène (Mo) Nickel (Ni) Chrome (Cr) Vanadium (V)	**300**	**30**	**30**	**3**
Métal avec une toxicité significative				
Classe-2 Cuivre (Cu) Manganèse (Mg) **Métal ayant une légère toxicité**	**2500**	**250**	**250**	**25**
Classe-3 Iron. (Fe) Zinc (Zn) **Métal avec un faible potentiel de toxicité**	**13000**	**1300**	**1300**	**130**

Tableau 2 : Les normes des métaux lourds spécifiés dans les médicaments

4. Evaluation du risque des métaux

Le terme « apport quotidien tolérable » (AQT) est utilisé par le Programme international sur la sécurité des substances chimiques (PISC) pour décrire les limites d'exposition à des produits chimiques toxiques, alors que le terme « dose journalière admissible » (DJA) est utilisé par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et d'autres organismes et instituts de santé nationaux et internationaux. Le nouveau terme « exposition journalière admissible » (EJA) est défini dans la directive du CIH Q3C comme l'apport admissible de solvants résiduels sur le plan pharmaceutique, dans le but d'éviter la confusion avec des valeurs différentes de DJA pour la même substance. Pour les métaux, le même terme (EJA) est défini dans la directive de l'EMEA (Agence européenne d'évaluation des produits médicamenteux).

On peut utiliser les limites de niveau en parties par million (ppm) figurant dans le tableau 2. Elles ont été calculées à l'aide de l'équation (1) ci-dessous, avec l'hypothèse qu'une masse de 10 grammes (g) de produit est administrée quotidiennement

$$Concentration\ (ppm) = \frac{1000EJA}{Dose} \qquad (1)$$

Avec EJA est en mg/jour et la dose en g/jour

III. Méthodes de contrôle des Métaux lourds dans les produits Pharmaceutiques

Lorsque les substances médicamenteuses, les excipients et les produits finis contiennent un métal issu d'un réactif ou un catalyseur utilisé durant la synthèse, la teneur de ce métal doit être recherchée. Les normes de chaque métal résiduel doivent prendre en considération sa classe ou sa toxicité. Quand il s'agit d'un métal de classe 1 une méthode spécifique est obligatoire selon l'EMEA. Cependant, pour les métaux de classe 2 et 3 des méthodes non spécifiques dites semi quantitatives peuvent être utilisées et selon l'EMEA considérées suffisantes.

1. Méthodes spécifiques pour la recherche des métaux lourds

Dans ce type de méthode, Les métaux résiduels sont déterminés par des techniques de dosage élémentaire comme l'émission Atomique par Plasma ou l'absorption Atomique. Des méthodes citées dans les pharmacopées peuvent être suivies si cela est possible, sinon une autre méthode validée est valable également. La validation de la dite méthode doit être faite selon les directives de la CIH.

1.1. Méthode semi -quantitative

Les métaux lourds de classe 1 et 2 peuvent être déterminés par une méthode non spécifique. Cette méthode est générale dite semi quantitative comme le test des métaux lourds. Des critiques ont été dressées à cette méthode telles que la sensibilité et la spécificité. Mais c'est une méthode qui garde toujours sa place dans les chapitres généraux de la pharmacopée européenne code (2.4.8) et américaine code (2 3 1).

2. Principe de la méthode « Test des métaux lourds »

La méthode de dosage des métaux lourds se base sur la formation d'un précipité **M-S** « métal sulfite » caractérisé par une coloration spécifique à chaque métal. Cette réaction de précipitation se fait à pH de 3,5 en présence de Thioacétamide. L'essai consiste à comparer la coloration développée pour la substance à examiner et le témoin de plomb d'une concentration bien définie. La figure suivante présente les colorations développées pour chaque métal.

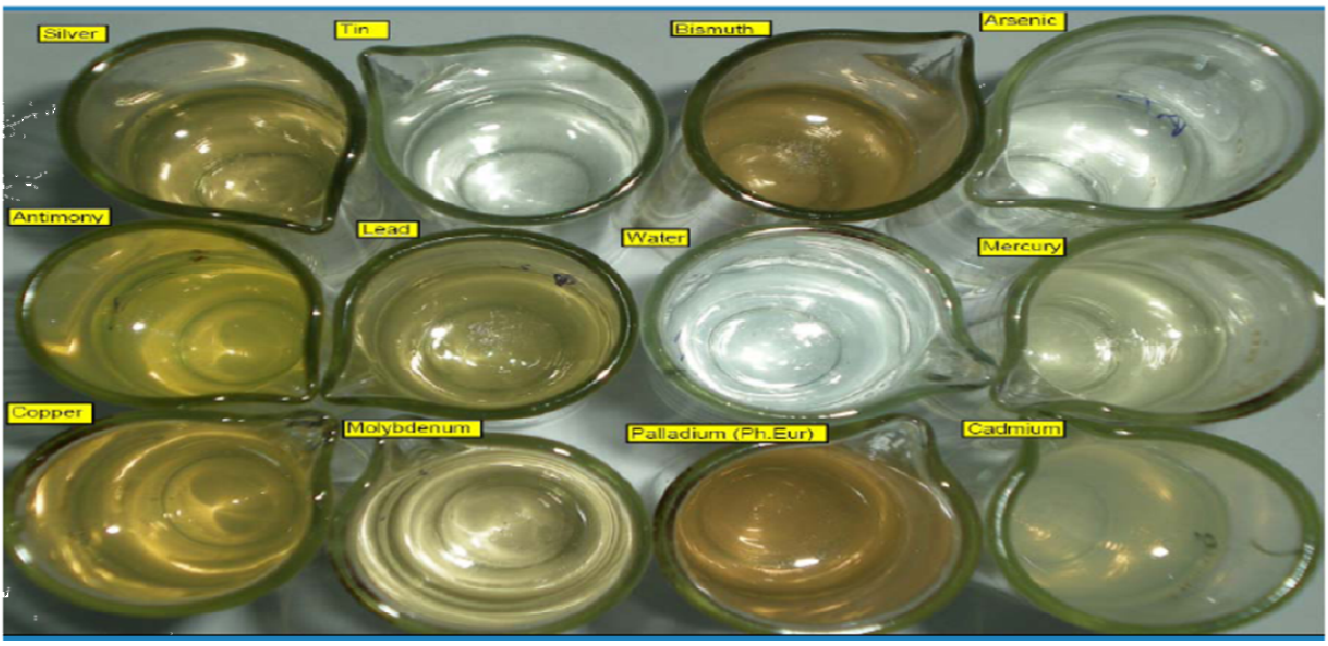


Figure 4: Coloration développée après réaction des métaux lourds
Comparaison à l'intensité de coloration par l'œil

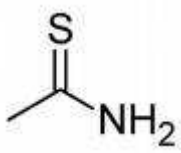
Le test des métaux lourds cité dans la Ph Eur se base sur la précipitation simultanée des ions métalliques présents dans la substance analysée. Cette précipitation se fait via une réaction entre les ions M et H_2S. Le gaz H_2S est produit in-situ dans la solution par l'hydrolyse de Thioacétamide.

$$CH_3CSNH_2 + 2H_2O \longrightarrow CH_3COONH_4 + H_2S$$

Et, sitôt formé, le gaz H_2S ne se dégage pas mais il réagit avec les solutions du métal selon cette équation :

$$H_2S + M^{2+} \longrightarrow MS + 2H^+ + 2n$$

Avec : CH_3CSNH_2 est la Thioacétamide de formule chimique développée



La maîtrise de test des métaux lourds passe donc par la maîtrise de deux phénomènes :

-Hydrolyse du Thioacétamide

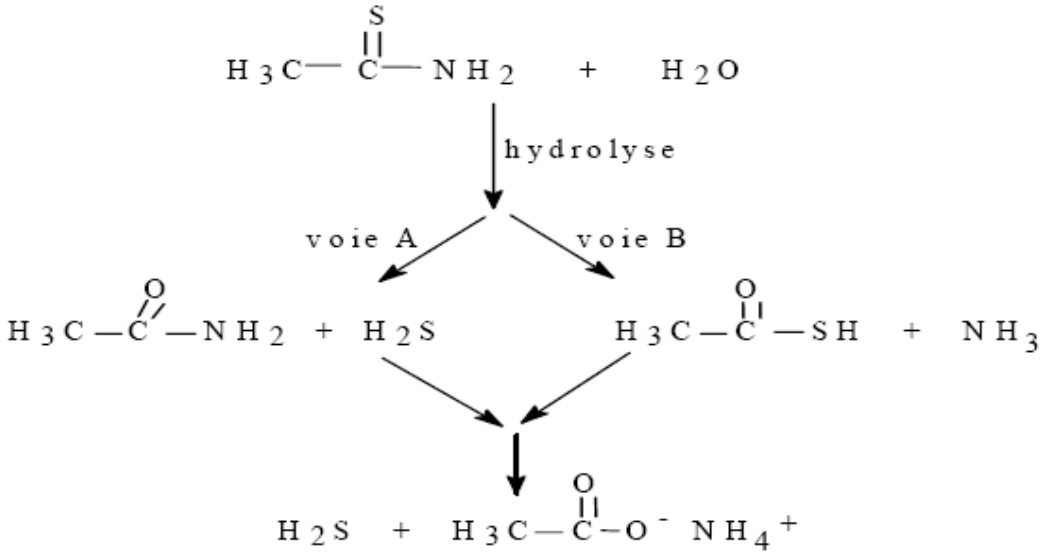
-Précipitation des sulfures métalliques

***Hydrolyse du Thioacétamide**

Thioacétamide est une substance soluble dans l'eau (point de fusion 111-113°C), facile à conserver, incolore et dégageant une très faible odeur. Par hydrolyse, le Thioacétamide donne H_2S et l'acétate d'ammonium. L'acétate d'ammonium formé ne dérange pas l'analyse car il est à faible concentration. L'hydrolyse de Thioacétamide est très lente en milieu neutre (pH=7).

En milieu acide, par exemple pH =1 à 80°C, 50 % de Thioacétamide s'hydrolysent après 45 minutes. En milieu basique par contre l'hydrolyse est 8 à 10 fois plus rapide qu'en milieu acide.

Pour le test des métaux lourds, le réactif Thioacétamide est préparé extemporanément (immédiatement avant l'utilisation) en milieu basique (NaOH) en chauffant au bain marie (100°C). Cette opération a pour objectif d'amorcer l'hydrolyse. En effet, deux voies d'hydrolyse sont possibles pour le Thioacétamide



Les recherches ont démontré qu'en milieu acide, l'hydrolyse s'effectue à environ 80 % par la voie A et à environ 20 % par la voie B. Par contre, en milieu alcalin c'est l'inverse qui se passe.

***Précipitation des sulfures métalliques**

La précipitation des sulfures métalliques à partir de H_2S est utilisée dans plusieurs domaines comme la séparation des métaux, le traitement de l'eau, le dépôt de couche mince des semi conducteurs…En

général, cette précipitation est fortement liée au pH de la solution. Dans le cas de test des métaux lourds la solution est maintenue à pH de 3,5 avec un tampon d'acétate. La question qui se pose à ce niveau, pourquoi faut-il opérer à ce pH ?

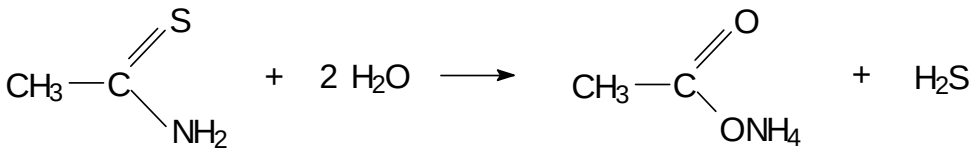
EXPLICATION THEORIQUE

Pour qu'un sulfure de type MS précipite, il faut que les concentrations des ions M^{2+} et S^{2-} dans la solution soient telles que :

$$[M^{2+}]\,[S^{2-}] > K_S$$

Avec Ks est la constante de solubilité. Pour les solutions étudiées la concentration $[M^{2+}]$ est de l'ordre de 10^{-7} M

Les ions S^{2-} proviennent de la dissociation de H_2S que l'on génère dans la solution par hydrolyse de la Thioacétamide :



$[S^{2-}]$ dépend donc du pH de la solution

$$\begin{cases} H_2S \Leftrightarrow HS^- + H^+ & Ka_1 = \dfrac{|H^+||HS^-|}{|H_2S|} = 10^{-7} \\ HS^- \Leftrightarrow S^{2-} + H^+ & Ka_2 = \dfrac{|H^+||S^{2-}|}{|HS^-|} = 10^{-13} \end{cases}$$

Soit $[S^{2-}] = \dfrac{K_1K_2 \cdot |H_2S|}{|H^+|^2}$

Si la solution est saturée en H_2S, ce qui sera le cas dans nos conditions opératoires, $[H_2S] = 10^{-1}$ M, donc :

$$[S^{2-}] = \frac{10^{-20} \times 10^{-1}}{\left|H^+\right|^2}$$

À pH = 3,5 : $\left|H^+\right| = 10^{-3,5}$ d'où $[S^{2-}] = 10^{-14}$ M

Dans ces conditions :

$$[M^{2+}]\,[S^{2-}] = 10^{-21},$$

Ce qui signifie que tous les sulfures pour lesquels $K_S \leq 10^{-21}$ précipitent. Il faudra donc prendre le plus grand soin de pH de la solution. Il se peut que pour des milieux trop acides, on risque de ne pas précipiter tous les cations souhaités.

IV. Les procédés de la pharmacopée pour le test des métaux Lourds

1. Définition de la Pharmacopée

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une pharmacopée est une norme pharmaceutique destinée à assurer dans une entité politique donnée, l'uniformité de la nature, de la qualité, de la composition et de la concentration des médicaments.

Il existe plusieurs pharmacopées : européenne, américaine (USP), Japonaise, Chinoise.

Chaque pharmacopée est constituée de plusieurs parties : Les monographies, les prescriptions générales, les réactifs et les méthodes générales d'analyses

Les procédés de la réalisation de la méthode de dosage des métaux lourds varient selon la solubilité des substances contrôlées. Dans le cas ou la substance est facilement soluble dans l'eau, le solvant utilisé pour la préparation des solutions examinées est l'eau. Dans le cas ou la substance est soluble dans les solvants organiques, ces derniers seront utilisés pour la préparation. Dans cette

logique les procédés cités dans la pharmacopée Européenne sont de 7 par contre dans l'USP ils sont de 3 uniquement.

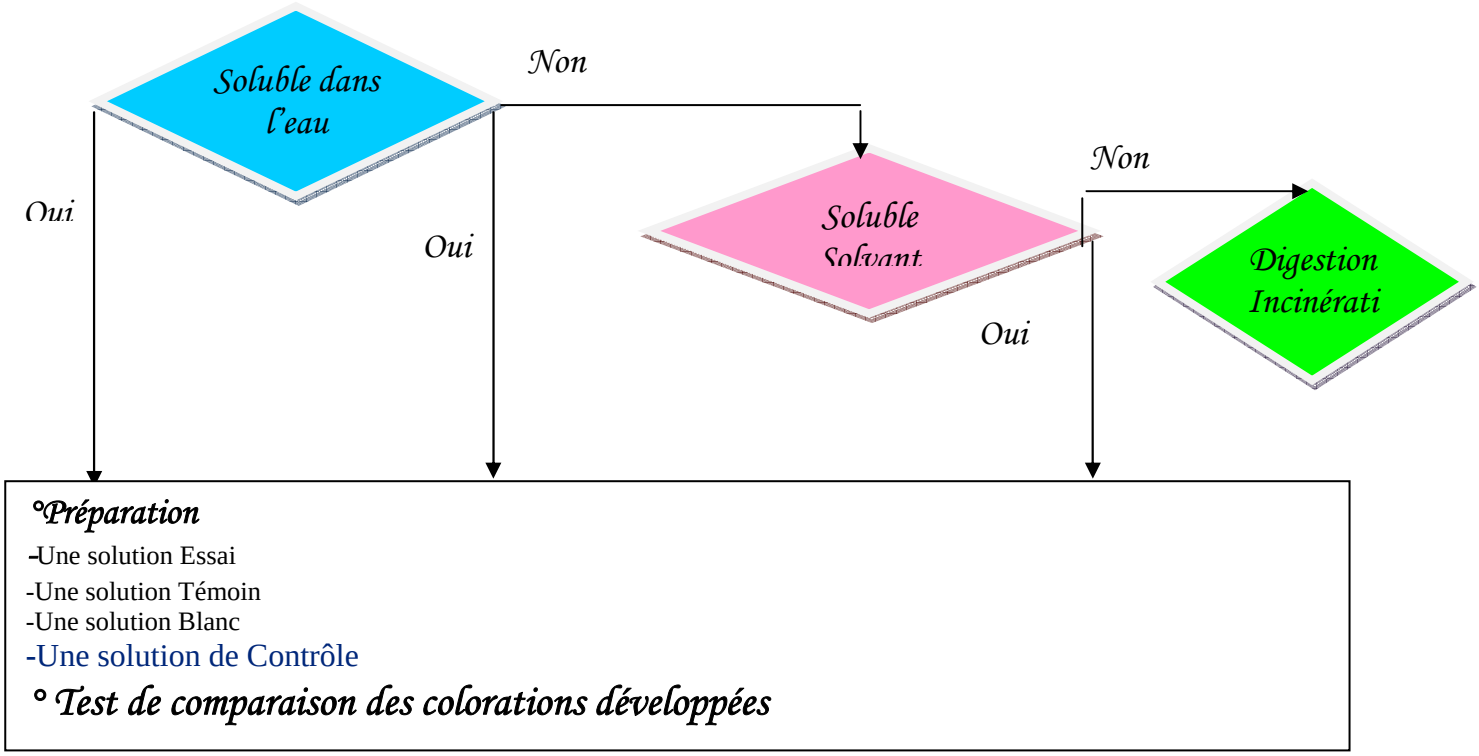


Figure 5: Les procédés de la réalisation de la méthode des métaux lourds selon la solubilité des substances contrôlées

Chapitre III

Partie expérimentale

I. matériels et méthodes

Pour réaliser les tests des métaux lourds on a besoin d'utilisation des réactifs et des méthodes

1. L'échantillonnage

Les matières premières étudiées :

- L'Acide Ascorbique
- NACL médicamenteux
- NACL de la cuisine
- Paracétamol
- Sertraline chlorhydrate.

2. Outil utilisé

2-1. réactifs commerciaux

1-Acide sulfurique dilué.

2-Acide chlorhydrique dilué.

3-Solution tampon pH 3,5.

4-acétate d'ammonium

5-d'acide chlorhydrique dilué

6-Ammoniaque diluée.

7- Réactif au Thioacétamide.

8-hydroxyde de sodium 1M

2.2. Matériels

La méthode semi-quantitative de recherche des métaux lourds souffre de deux points faibles essentiels :

- La difficulté de faire la comparaison entre les solutions à l'œil nu surtout si la coloration est très légère

- la manque de traçabilité

Pour combler cette faiblesse nous avons pensé à utiliser la spectrophotométrie dans le visible pour caractériser les solutions (Blanc, témoin, de contrôle et examinée) afin de comparer l'intensité des solutions.

- **Le spectrophotomètre UV/visible :**

Le spectrophotomètre UV/VIS utilisé est un appareil à double faisceau Lamba 35 de marque PERKIN ELMER. Cet appareil subit une qualification périodique en interne. Les cuvettes du spectrophotomètre utilisées sont des cuves d'un volume de 1ml.

- Matériel du laboratoire (fiole, pipette……)
- Tubes à essais pour l'incubation des réactions
- Bain ultrason pour la solubilisation
- Balances analytiques pour des prises d'essais de précision.
- Système de filtration.

2.2.1 : Rappel sur la spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

Dans le domaine de l'ultraviolet visible, L'identification nécessite l'emploi d'une substance de référence. On enregistre d'abord le spectre de référence puis dans les mêmes conditions celui de la substance à identifier et /ou à doser.

La figure 6 présente le schéma du spectrophotomètre

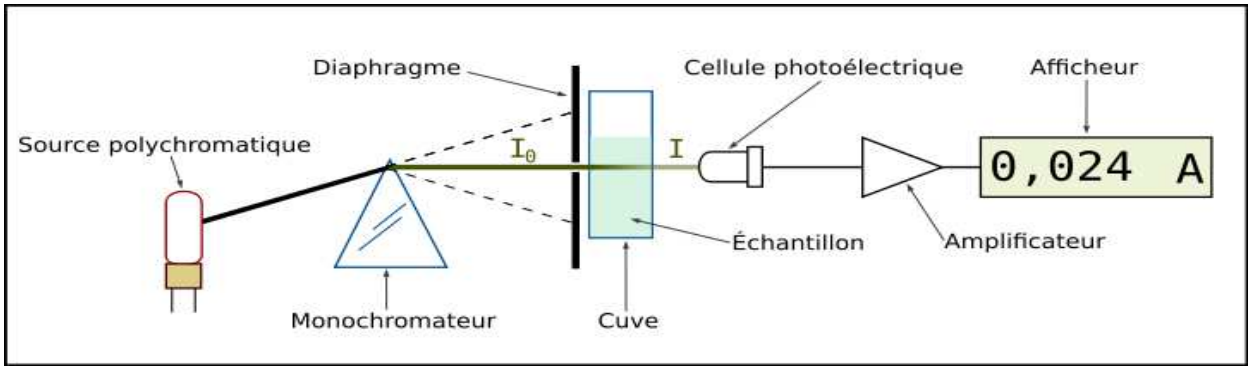


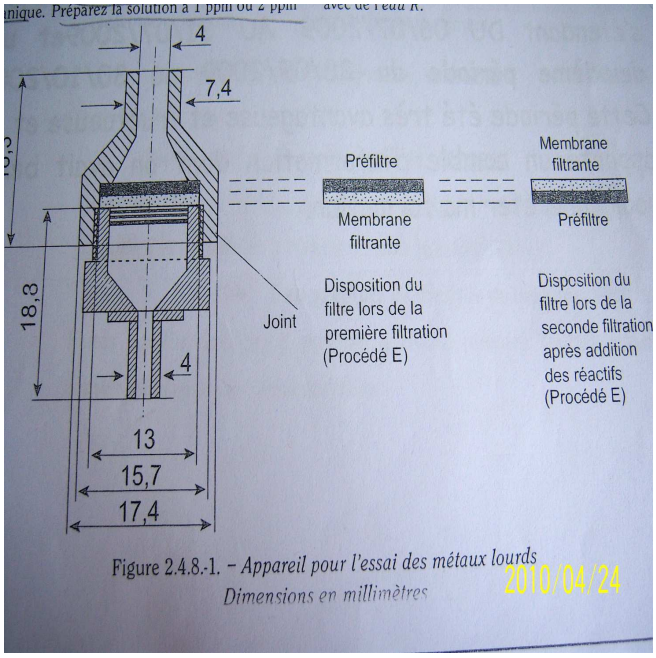
Figure 6*:* Schéma du spectrophotomètre

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0. On définit l'absorbance de la solution comme :

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité.

2.2.2. Système de filtration



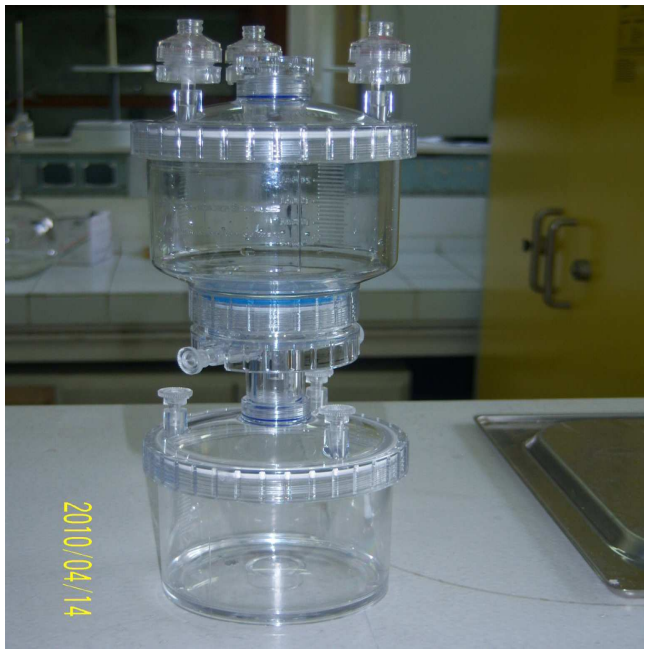


Figure 7a : schéma de système de filtration

Figure7b: système de filtration Selon PH.Eur

3. Présentation des procédés de la pharmacopée européenne

Le test de la recherche des métaux lourds selon la pharmacopée européenne se fait par un ensemble de procédés. Ils sont en nombre de 7 et ils sont désignés par des lettres de A jusqu'à G.

Méthode A : on utilise une solution aqueuse pour préparer notre échantillon

Méthode B : on utilise un solvant organique pour prépare notre échantillon

Méthode C : on utilise $MgSO_4$, on pratique la carbonisation, la température doit être <800 °C, le temps <2h

Méthode D : on utilise MgO , on pratique la carbonisation, la température doit être <800 °C , le temps <1h

Méthode E **:** on utilise deux fois la filtration : avant et après l'ajout des réactif

Méthode F : on utilise le chauffage pour toutes les étapes de filtration

Méthode G :fluoropolymère à micro-ondes de pression ou de la digestion des vases en verre de Quartz sont utilisés

Le choix entre ces procédés prend en considération le caractère de solubilité de la matière première analysée. Pour les matières premières dont la monographie est citée dans la pharmacopée, le procédé qui doit être utilisé est cité dans le test « Métaux lourds » dans lequel la norme est citée également.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude sur les procédés les plus utilisés dans la pharmacopée européenne.

Pour réaliser cette étude nous avons consulté toutes les monographies des molécules inscrites dans la pharmacopée européenne 6.0, tome 2, année 2008 disponible au service physico-chimique du LNCM. L'histogramme de la figure suivante présente la fréquence d'utilisation de chaque procédé.

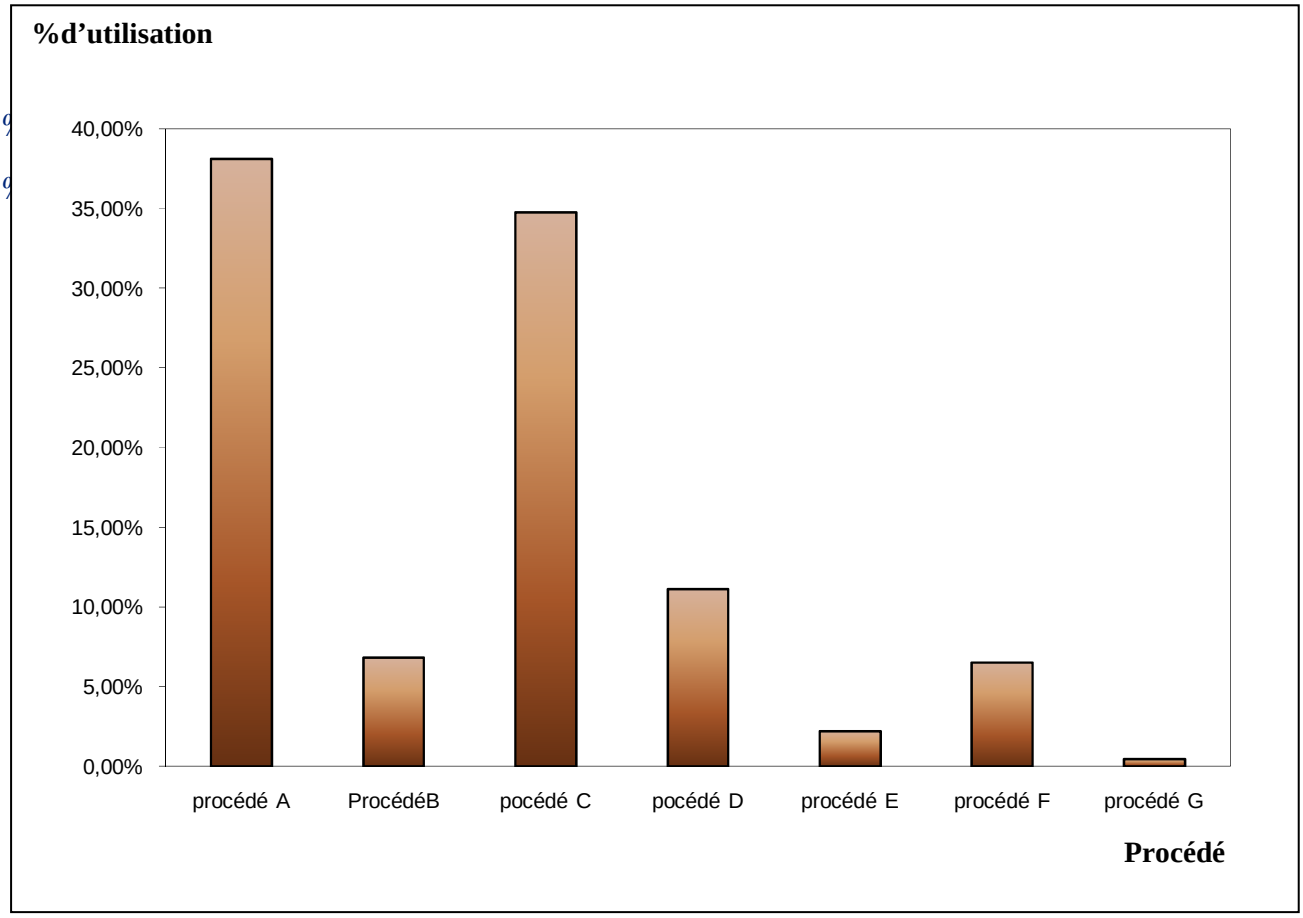


Figure 8: les procédés les plus utilisés dans la pharmacopée européenne pendant l'année 2008

D'après les résultats trouvés on peut constater que les procédé A et C sont les plus utilisés

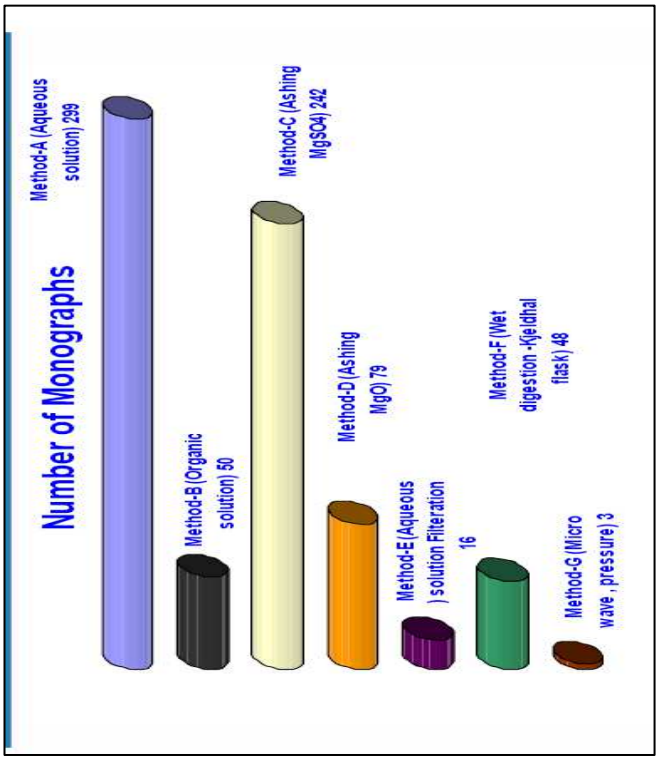


Figure 9: Les procédés de recherches des métaux lourds (Etude déjà faite) Selon PH.Eur

Le protocole de chaque procédure est cité en détail dans la pharmacopée européenne partie des chapitres généraux, Nous avons voulu transformer les protocoles da chaque procédé sous forme d'organigramme dans le but de rendre facile la compréhension et la pratique de chaque procédé. De plus cette transformation apportera plus tard une aide pour la rédaction des procédures techniques du laboratoire qui est le but visé par le chef de service Physico-chimique.

4. Préparation des réactifs

Dans les procédés les réactifs utilisés sont classés selon trois types

- **Réactifs commerciaux prêt à l'emploi**

*Acide sulfurique dilué.

*Acide chlorhydrique dilué.

*Acétate d'ammonium

*Acide chlorhydrique dilué

*Hydroxyde de sodium 1M

- **Des réactifs préparés chimiquement stables et peuvent être conservés**

*Solution témoin de 1000ppm

*Solution de NaOH

*Tampon pH 3,5

*Solution de thioacétamide

- **Les réactifs préparés extemporanément chimiquement instableS**

*Solution témoin de 1 ppm (voire figure11)

*Réactif de Thioacétamide (voir figure12).

Le schéma suivant présente l'organigramme des procédés A et B. Il faut rappeler que la différence entre le procédé A et B réside dans le solvant utilisé uniquement. Dans le procédé A, les solutions préparées sont des solutions aqueuses. Dans le procédé B le solvant qui doit être utilisé pour la préparation des solutions est un solvant organique. Le solvant adéquat sera précisé par la monographie de la substance examinée qui est dans la majorité des cas le Dioxane ou l'Acétone.

5. présentation des procédés A et B

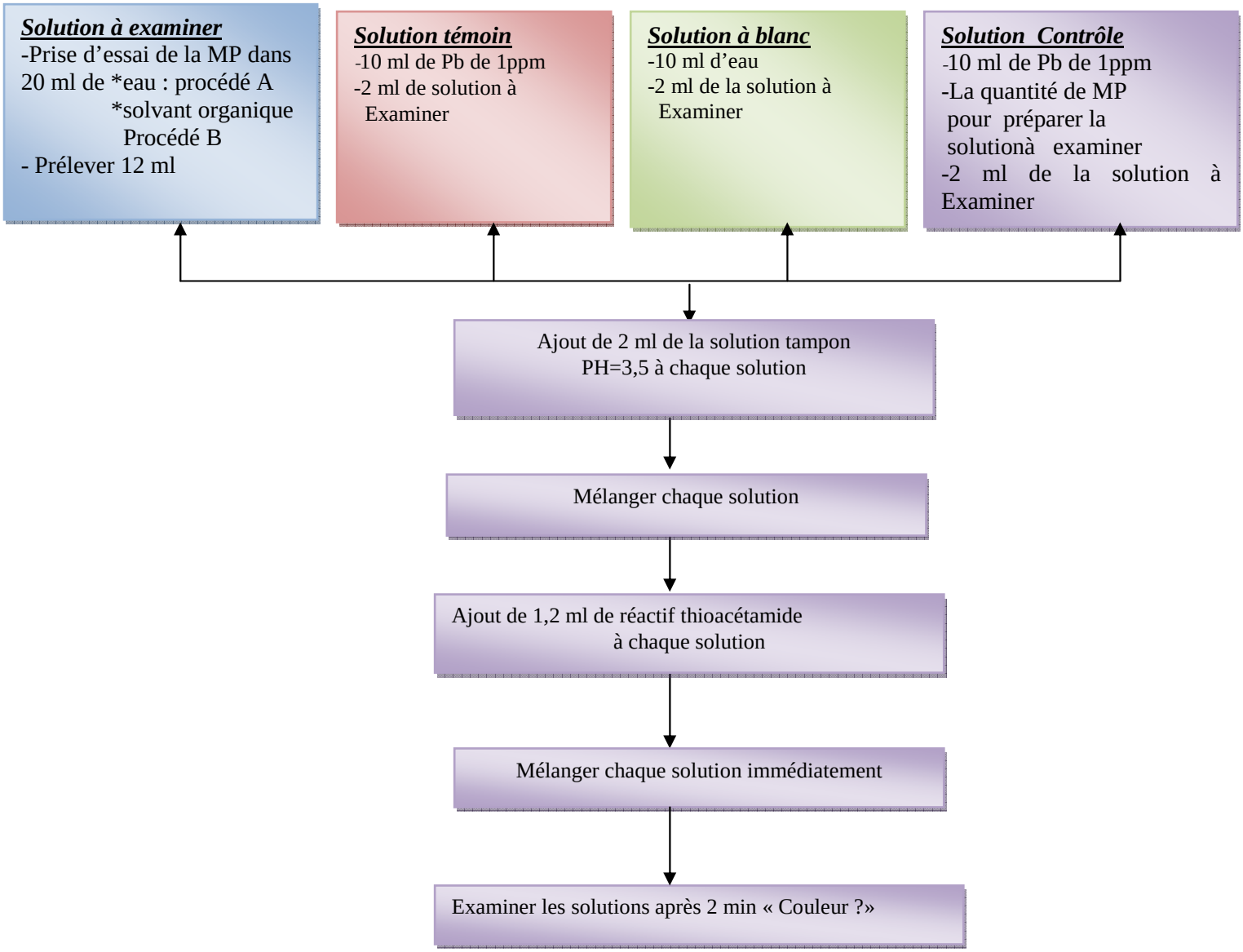


Figure 10: logigramme du procédé A et B

5-1 préparation de solution 1 ppm

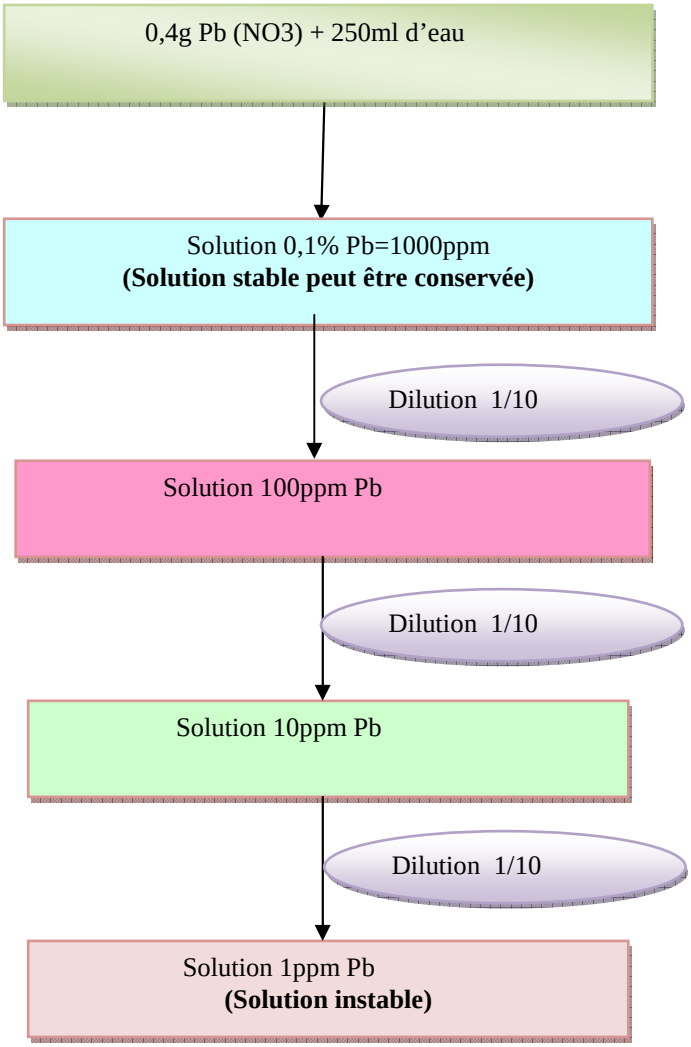


Figure 11: Les étapes à suivre pour la préparation de la solution Pb à 1ppm

5.2. Réactif Thioacétamide

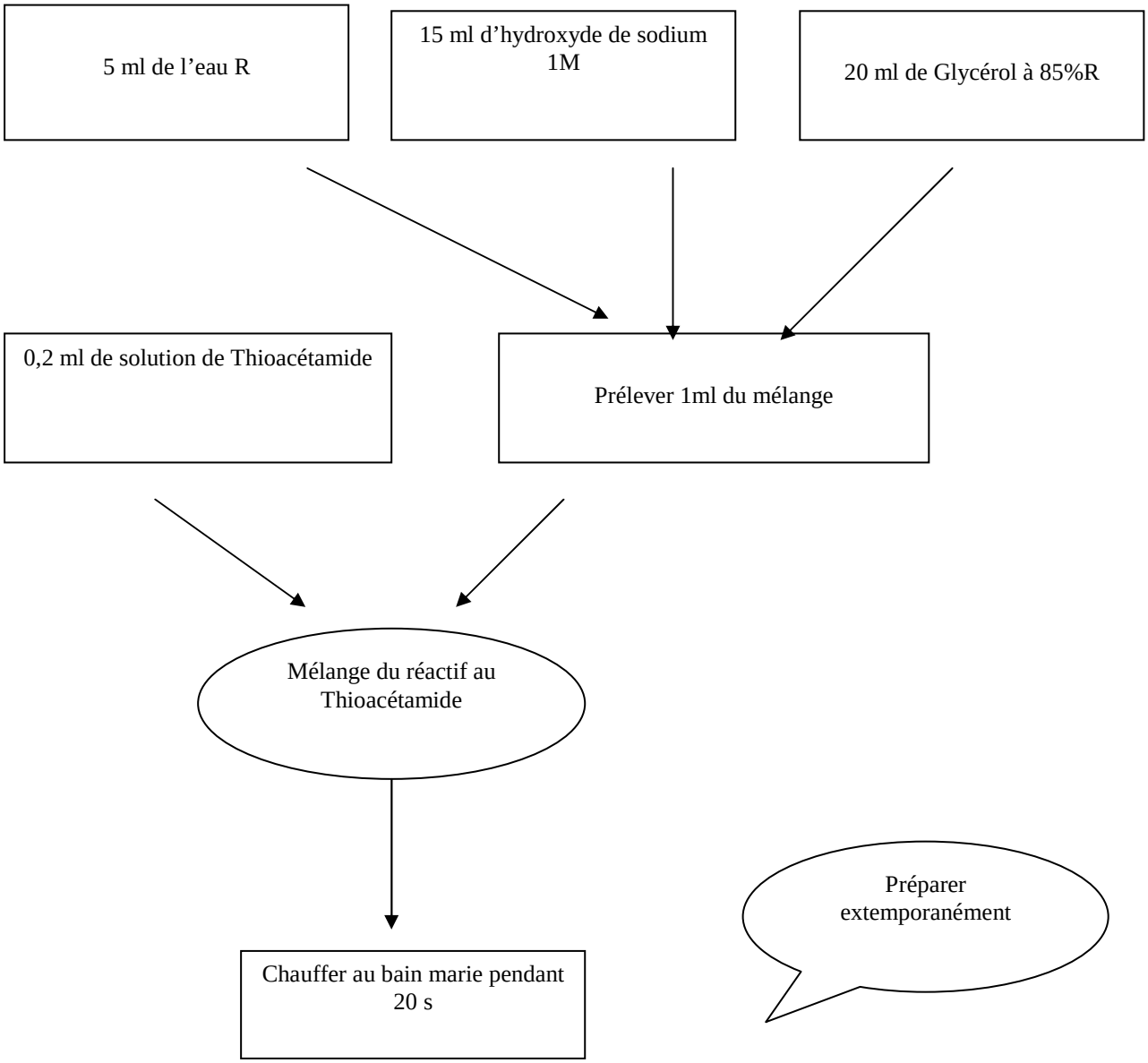


Figure 12 : préparation du réactif Thioacétamide

II. Méthode d'interprétation des résultats

Les solutions sont mises dans des tubes à essais auxquelles on ajoute une succession de réactifs pour aboutir à un précipité coloré du à la réaction du Thioacétamide. La comparaison des couleurs développées se fait dans un premier temps à l'œil nu. Dans le cas de doute, les solutions sont filtrées sur des filtres spéciaux et la comparaison se fait cette fois-ci entre les couleurs condensées sur les filtres. Seulement, il faut noter que la réaction de Thioacétamide donne H_2S comme produit. Le gaz H_2S est un gaz toxique et possède une odeur désagréable. Pour cette raison, il est conseillé de faire le test des métaux lourds dans un endroit aéré au cours de l'étude.

Généralement les rejets de ce test sont mettent dans un bidon de rejet qui sera traité par la cellule des rejets chimiques du LNCM.

1. Vérification de conformité du test

- Comparaison entre la solution à Blanc et la solution témoin : La solution témoin doit présenter une légère coloration brune par rapport à la solution blanche.
- Comparaison entre la solution contrôle et la solution témoin : Le test n'est valable que si la solution contrôle est au moins aussi intense que la solution témoin.

2. Décision

Si la solution examinée est moins intense que la solution témoin, le test est conforme selon les normes citées. Sinon le résultat est non conforme. Dans le cas de doute on procède à une filtration pour condenser les colorations sur les filtres puis comparer cette fois ci les couleurs de chaque filtre. La figure suivante présente l'organigramme décisionnel utilisé pour la réalisation d'un test des métaux lourds.

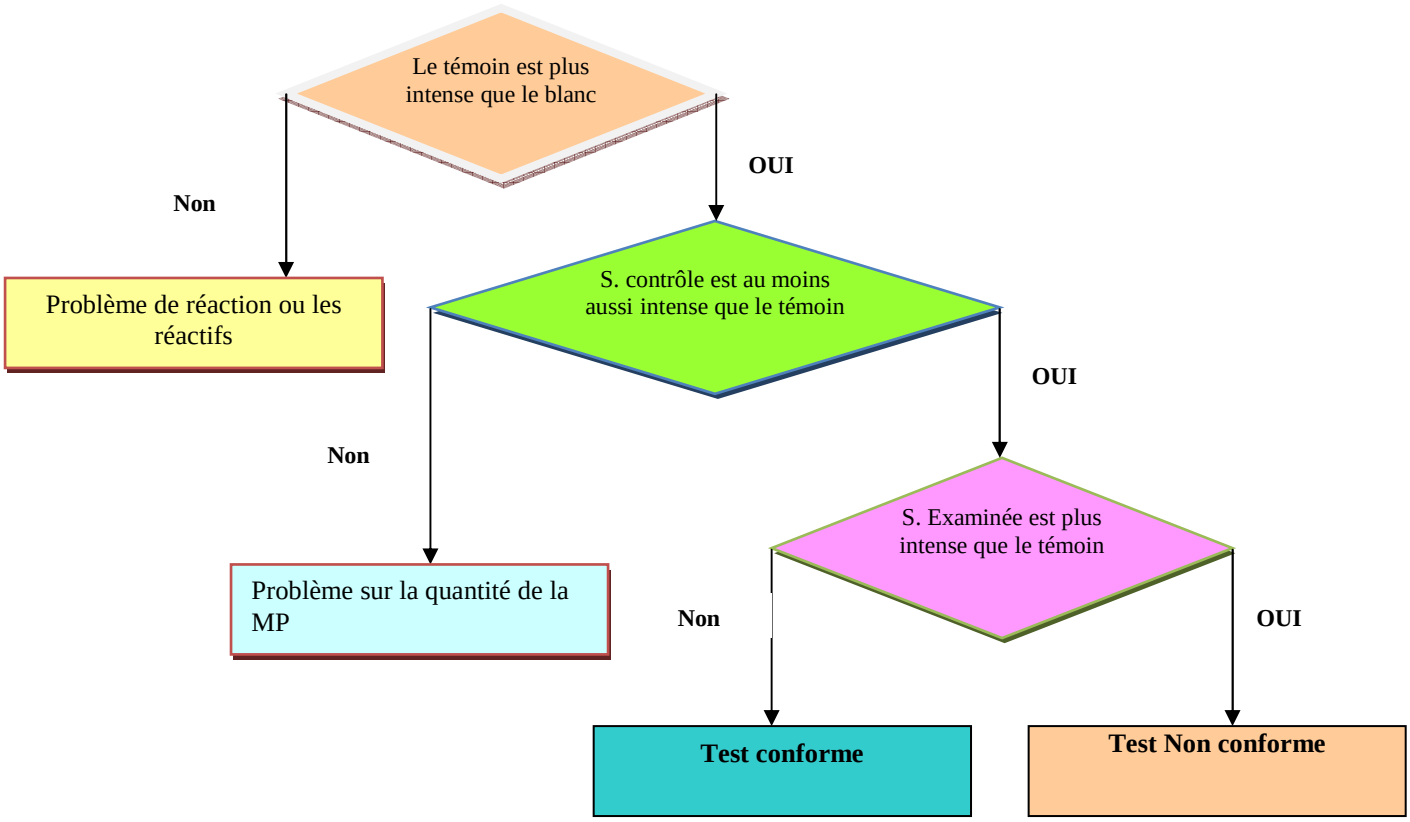


Figure 13: Organigramme décisionnel utilisé pour interpréter un test des métaux lourds

3. Vérification de l'efficacité de la spectrophotométrie et stabilité du réactif Thioacétamide

3.1. L'efficacité de la spectrophotométrie

Des solutions témoin de plomb de (0ppm, 2ppm, 5ppm, 8ppm, 10ppm et de 500 ppm) ont été préparées. Nous avons réalisé ensuite le test des métaux lourds avec ces solutions. Après développement des colorations nous avons réalisé la comparaison des colorations des filtres. Les figures 14a et 14b présentent les résultats obtenus.