

N° d'ordre :

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par

Mr AMARA Belkacem

Melle BELHOCINE Chahinez

Thème

**IMPACT DE LA CHIRALITE SUR LE CHOIX DE LA METHODE
D'ANALYSE DU CLOPIDOGREL BISULFATE**

Soutenu publiquement le 09/ 10 / 2013 devant le jury composé de

Mme DELLAH Saliha
Mme BELMAHDI Lila
M
Mme FERNANE Farida
Mme HIKEM Djamilia

MCA – UMMTO
MAA – UMMTO
CRD-SAIDAL
MCA – UMMTO
MCB – UMMTO

Présidente
Rapporteur
Co-rapporteur
Examinatrice
Examinatrice



Remerciements

C'est avec une certaine émotion et beaucoup de sincérité que nous voudrions remercier toutes les personnes ayant soutenues notre travail.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de chimie analytique au centre de recherche et développement Saidal.

*En premier lieu, nous tenons à exprimer notre reconnaissance à **M^{me} : Aberbache Nefissa**, pour avoir proposé ce sujet de recherche si passionnant et intéressant et pour ses suggestions pertinentes et ses précieux conseils dont nous avons pu bénéficier au cours de ce travail.*

*Nos profonds remerciements vont conjointement à notre promotrice **M^{me} : Belmahdi Lila**, pour son suivi constant, son œil critique dans la correction de ce travail, et pour sa disponibilité. Ses précieux conseils nous ont été d'un grand profit.*



*Nous remercions également **M^{lle} : Boubekur Sihem**, et tout le personnel du laboratoire de chimie analytique.*

*Nous adressons également notre profonde gratitude à **M^{lle} : Ghardaoui Dhahbia**, étudiante en magister chimie organique, pour l'intérêt qu'elle a porté à notre travail.*

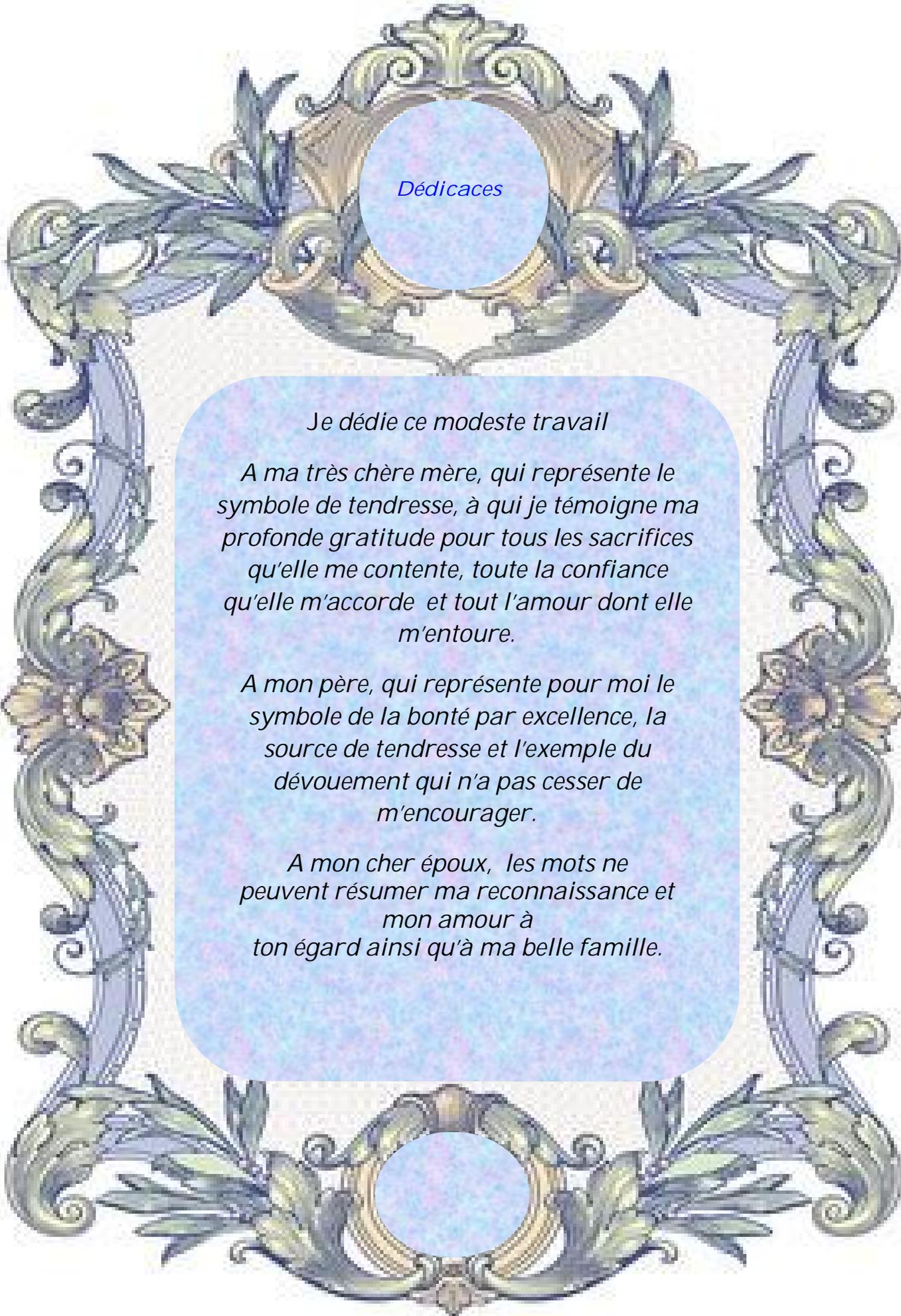
*Nous remercions **M^{me} : Fernane Farida**, pour les éclaircissements qu'elle nous a apportés et pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous remercions **M^{me} Dellah Saliha**: pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.*

*Nous remercions également **M^{me} : Hikem Djamila** pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Un grand merci à **M^r Mamou marzouk** pour nous avoir procuré des réactifs nécessaires à nos expériences.*

Merci



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A ma très chère mère, qui représente le
symbole de tendresse, à qui je témoigne ma
profonde gratitude pour tous les sacrifices
qu'elle me contente, toute la confiance
qu'elle m'accorde et tout l'amour dont elle
m'entoure.*

*A mon père, qui représente pour moi le
symbole de la bonté par excellence, la
source de tendresse et l'exemple du
dévouement qui n'a pas cessé de
m'encourager.*

*A mon cher époux, les mots ne
peuvent résumer ma reconnaissance et
mon amour à
ton égard ainsi qu'à ma belle famille.*



*A mes chers frères et à mes adorables sœurs
à qui je ne trouverai jamais assez de mots
pour leurs exprimer mon amour, en leurs
souhaitant plein de succès.*

A ma grand-mère, que dieu la garde.

*A mon binôme, Belkacem et à toute sa
famille.*

*A toutes mes amies que je remercie pour leur
soutien et leurs encouragements. A tous mes
camarades du Master chimie
pharmaceutique.*

A tous mes enseignants

A tous ceux qui me sont chers.

*Chahinez
Belhocine*



Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail
A celle qui m'a donné la vie, symbole
de tendresse,
qui s'est sacrifiée pour mon bonheur
et ma réussite,
à ma très chère mère.*

*A mon père, école de mon enfance,
qui a été mon
ombre durant toutes les années
d'études, et qui a veillé
tout au long de ma vie à
m'encourager, à me donner
l'aide et à me protéger.*

Que dieu les gardes et les protèges.



*A mon cher frère et à mes adorables sœurs à
qui je ne trouverai jamais assez de mots pour
leurs exprimer mon amour, en leurs
souhaitant plein de succès.*

A ma grand-mère, que dieu la garde.

*A mon binôme, Chahinez et à toute sa
famille.*

*A tout mes amis que je remercie pour leur
soutien et leurs encouragements. A tous mes
camarades du Master chimie
pharmaceutique.*

A tous mes enseignants

*A tous ceux qui m'aiment
A tous ceux que j'aime.*

*Belkacem
Amara*

Liste des abréviations

% : pourcentage.

¹⁴C : carbone 14.

ADP : adénosine diphosphate

API : Active pharmaceutical ingredients

C* : carbone asymétrique.

CFS : chromatographie à fluide supercritique.

CHLP : chromatographie liquide à haute performance.

CLP: clopidogrel.

Cmax : concentration maximale.

CMEC : chromatographie micellaire électrocinétique.

CP : Comprimé.

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

CRD-Saidal : Centre de Recherche et Développement Saidal.

CYP450 : cytochrome P450.

d : dextrogyre

E : entgegen (en allemand).

EC: électrophorèse capillaire.

ECC: électrochromatographie capillaire.

ECZ : électrophorèse capillaire de zone.

h : heure

Liste des abréviations

HPLC: high performance liquid chromatography.

IR : spectroscopie infrarouge.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

l : levogyre.

LC : liquid chromatography (chromatographie liquide).

m/v : masse à volume.

min : minute

MS : mass spectrometry.

Pa : principe actif.

PEG : polyéthylène glycol.

PI: Phase inverse.

PM : Phase mobile.

PN: phase normale.

PS : Phase stationnaire.

R : rectus

RMN : spectroscopie de résonance magnétique.

S : sinister.

SM : spectrométrie de masse.

t_{1/2} : temps de demi-vie.

T_R : temps de rétention.

USP : United State pharmacopeia (pharmacopée américaine).

Liste des abréviations

UV : ultra violet.

V : visible.

v/v : volume à volume

Z : zusammen (en allemand).

Résumé

Afin de contrôler la pureté du CLP bisulfate et de déterminer ses impuretés, dans la matière première (API) et dans les échantillons plavix© et plagrel®, par une méthode de HPLC simple, efficace économique, le groupe CRD-Saidal a remplacé la méthode monographiée dans l'USP utilisant une PS chirale, qui est onéreuse et qui surtout ne permet pas de séparer toutes les impuretés achirales, par une méthode HPLC en phase inverse.

Dans un premier temps, nous avons effectué une comparaison entre ces deux méthodes.

A l'issue de cette comparaison et sur la base des résultats obtenus, la méthode basée sur une colonne achirale a pu identifier les impuretés inconnues (dérivé de dihydro pyridinone et CLP décarbméthoxylaté) du plagrel® et du plavix©. D'après la littérature, les études de compatibilités montrent que le polyéthylène glycol (PEG), utilisé comme excipient, étant responsable de la génération de ces impuretés.

D'autres impuretés ont été identifiées dans les trois échantillons par cette colonne, le métabolite acide carboxylique (impureté A), l'impureté d'oxydation (méthyle ester de dihydro pyridinone-2).

Cette méthode n'est pas capable de séparer des impuretés chirales. Nous avons obtenu un seul pic pour l'impureté B (stéréoisomères B₁ et B₂ du CLP bisulfate) et pour le CLP bisulfate.

L'impureté C (énantiomère R du CLP bisulfate) est incluse dans le pic CLP bisulfate.

Mots clés : CLP bisulfate, impuretés, HPLC, colonne achirale.

Abstract

In order to monitor the purity of CLP bisulfate and to determine its impurities, in the raw material (API) and in the simples plavix© and plagrel®, by simple, efficient and economic HPLC method, the CRD-Saidal group have replaced the USP method using a chiral stationary phase, wich is expensive and mostly doesn't separate all achiral impurities, by reverse phase HPLC method.

In a first time, we have performed a comparison between these two methods.

At the end of this comparison and in base of obtained results, the method based on an achiral column could identify the unknown impurities (Dihydro pyridinone Derivative, Decarbmethoxylated CLP) of drug products tablets plagrel ®and plavix©. According to the literature, the compatibility studies show that the PEG, used as excipient, is responsible of the generation of these unknown impurities.

Others impurities have been identified in the three simples by this column, the metabolite carboxylic acid (impurity A), the oxidation impurity (Methyl ester of Dihydropyridinone-2).

This method isn't able to separate chiral impurities. We have obtained a single peak for the impurity B (stereoisomers B₁ and B₂ of CLP bisulfate) and for CLP bisulfate.

The impurity C (énantiomer R of CLP bisulfate) is included on the peak of CLP bisulfate.

Keywords: CLP bisulfate, impurities, HPLC, achiral column.

Liste des figures

Figure 01 : principe de la chiralité.....	4
Figure 02 : diastéréoisomères Z et E.....	6
Figure 03 : Relation entre énantiomères et diastéréoisomères.....	6
Figure 04 : Enantiomères de l'herbicide du dichloroprop.....	8
Figure 5 : Clopidogrel.....	11
Figure 6 : Métabolismes du clopidogrel et la fixation sur le récepteur P2Y.....	15
Figure 7 : Métabolisme du S et R dans l'in vivo en quatre diastéréoisomères.....	16
Figure 8 : Énantiomères S et R du CLP.....	17
Figure 9 : Composants d'un chromatographe liquide à haute performance.....	21
Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'une boucle d'échantillonnage.....	23
Figure 11 : Appareil d'électrophorèse capillaire.....	28
Figure 12 : PLAVIX® 75mg (boite de 28 CP).....	30
Figure 13 : Plagrel® 75mg (boite de 28 CP).....	31
Figure 14 : HPLC water utilise équipé du logiciel Empower 3.....	32
Figure 15 : Colonne C18 kromasil, 5µm (4.6 x 250) mm.....	37
Figure 16 : Dérivé de dihydro pyridinone (impureté inconnue).....	42
Figure 17 : Clopidogrel décarbométhoxylaté (impureté inconnue).....	42
Figure 18 : Méthyl ester de dihydro pyridinone-2 (impureté connue).....	43
Figure 19 : impureté A.....	43
Figure 20 : impureté B.....	43
Figure 21 : Enantiomère R du CLP (impureté C).....	49
Figure 22 : Impureté E.....	50

Liste des tableaux

Tableau 01 : Concentration maximale et temps de demi-vie du CLP en dose unique moyenne.....	14
Tableau 02 : Type de chromatographie selon la nature de la PM et de la PS.....	18
Tableau 03 : Type de chromatographie selon la nature du phénomène.....	19
Tableau 04 : Type de chromatographie selon le type d'application.....	19
Tableau 05 : Type de chromatographie selon le support de la PS.....	20
Tableau 06 : Masse des dix comprimés de PLAVIX©.....	34
Tableau 07 : Masse des dix comprimés de PLAGREL®.....	35
Tableau 08 : Standard.....	38
Tableau 09 : Plavix©.....	38
Tableau 10 : Plagrel®.....	38
Tableau 11 : Standard avec impuretés.....	39
Tableau 12 : Plavix© avec impuretés.....	40
Tableau 13 : Plagrel® avec impuretés.....	41
Tableau 14 : Présence ou absence de l'impureté 1 dans les échantillons plavix© et plagrel®.....	45
Tableau 15 : Présence ou absence de l'impureté A dans les trois échantillons.....	45
Tableau 16 : Présence ou absence de l'impureté 2 dans les échantillons plavix© et plagrel®.....	46
Tableau 17 : Présence ou absence de l'impureté connue dans les trois échantillons.....	46
Tableau 18 : Présence ou absence de l'impureté B dans les trois échantillons.....	47
Tableau 19 : Impuretés communes entre les trois échantillons.....	47
Tableau 20 : Impuretés propres au plavix©.....	48
Tableau 21 : Impuretés propres au CLP.....	48

Introduction générale

Les formes chirales nous entourent sans que nous soyons toujours conscients. Cette notion de chiralité, caractéristique d'un objet existant sous deux formes mais non superposables, joue un rôle primordial dans les processus biologiques et chimiques, en particulier, depuis le dramatique accident lié à l'utilisation de la thalidomide, la nécessité de mener des études pharmacologiques sur les isomères séparés est mise en évidence.

Le problème qui se pose, est de savoir si on peut continuer à fabriquer des médicaments dont le principe actif est sous formes racémique ou s'il est préférable de séparer les énantiomères et d'avoir une forme optiquement pure. Les compagnies pharmaceutiques font souvent elles-mêmes leur choix selon des critères presque exclusivement économiques. Certaines préfèrent la commercialisation d'un racémique à moindre coût et d'autres préfèrent la commercialisation d'une forme énantiomérique. La loi impose à toute industrie pharmaceutique désireuse de développer un nouveau médicament sous forme racémique, de prouver l'activité des deux énantiomères ou bien de montrer que l'énantiomère dit « indésirable » ne présente pas d'effets secondaires.

Etant donné que deux énantiomères peuvent avoir des activités biologiques totalement différentes (l'un actif et l'autre présente des effets indésirables), leur séparation est donc indispensable. A cette fin, il existe deux possibilités de séparation : soit synthétiser les énantiomères de façon optiquement pure (synthèse énantiosélective), soit les séparer après synthèse (discrimination chirale ou dédoublement d'un racémique).

Il existe de nombreuses techniques de séparation et d'analyse d'énantiomères telles que les méthodes chromatographiques et électrophorétiques afin de déterminer leur pureté énantiomérique.

La méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la plus utilisée pour séparer un mélange racémique, car elle permet une purification et une détermination quantitative de chaque énantiomère. La résolution directe d'énantiomères, soit par l'utilisation d'une phase stationnaire chirale soit par l'utilisation d'additifs chiraux dans la phase mobile, est généralement la voie la plus fréquente.

Le CLP bisulfate est un antiagrégant plaquettaire de la catégorie des inhibiteurs de la voie de l'ADP, c'est un dérivé de thiényridine, cette molécule possède un C* menant à l'existence de deux énantiomères R et S. Seule la forme S est active.

Introduction générale

Il est plus utilisée actuellement depuis l'abandon de la ticlopidine à cause des effets secondaires (hémorragie digestive), administré seul, chez les patients intolérants à l'aspirine, le CLP bisulfate n'est que marginalement plus efficace que celle-ci ; il présente le même risque hémorragique mais le CLP bisulfate est généralement prescrit en combinaison avec l'aspirine.

Il est commercialisé sous une seule forme énantiomérique qui est le S-clopidogrel. Ce produit veut être lancé sur le marché par le groupe Sidal, le fournisseur de la matière première est le groupe Ind.swift. Dans le but de contrôler sa pureté et de déterminer ses impuretés, plusieurs méthodes analytiques ont été appliquées, l'USP préconise une méthode HPLC utilisant une phase stationnaire chirale mais cette dernière étant très coûteuse, et elle ne permet pas de séparer toutes les impuretés en particulier celles achirales d'où l'intérêt de rechercher une autre méthode qui nous permettra d'atteindre cette objectif.

Dans ce manuscrit, la première partie sera consacrée à une recherche bibliographique où nous donnerons quelques notions sur la chiralité et son influence dans le domaine thérapeutique. Par la suite, nous présenteront les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du CLP bisulfate. Nous décrirons ensuite les différentes méthodes d'analyse (HPLC, techniques électrophorétiques).

Notre travail expérimental est subdivisé en deux parties, la première est consacrée aux matériels et méthodes utilisés, la seconde aux résultats et discussion.

Chapitre I : Chiralité

1 Historique [2]

Le début du 19^{ème} était l'âge de la géométrie optique. Plusieurs scientifiques étudiaient la diffraction, l'interférence et la polarisation de la lumière.

La notion de chiralité est apparue avec le développement des disciplines scientifiques telles que la chimie et la physique.

En 1808, un jeune polytechnicien Etienne-Louis Malus découvrit la lumière polarisée. Puis quelques années plus tard, en 1838, Jean-Baptiste Biot démontra que l'acide tartrique déviait le plan de polarisation de la lumière alors qu'un autre acide-dont la forme de ses cristaux est identique à l'acide tartrique-appelé acide racémique (racemus : grappe de raisin) était inactif.

Louis Pasteur expliquait, en 1847, la différence de l'action de ces deux formes de cet acide sur la lumière polarisée et établit une relation entre pouvoir rotatoire et dissymétrie moléculaire, il remarqua que les cristaux de l'acide tartrique optiquement actifs avait des facettes particulières qui semblaient absents des cristaux non polarisants. Les cristaux inactifs sont symétriques tandis que les cristaux actifs sont asymétriques. Il analysa attentivement les gros cristaux de l'acide tartrique inactif, il remarqua l'existence de deux types de cristaux en quantités égales. Tous les deux étaient asymétriques et image l'un de l'autre dans un miroir. Pasteur conclut que puisqu'une partie des cristaux déviait la lumière vers la gauche et l'autre partie vers la droite, les effets de la déviation s'annulaient.

En 1874, le Français Le Bel et le Hollandais Vant'Hoff introduisaient la théorie du carbone tétraédrique substitué avec quatre groupements différents et créant le concept du C* qui en est la cause de la dissymétrie moléculaire et de l'activité optique.

A partir de là, la chiralité est née, qui a été défini par Lord Kelvin en 1883.

2 Chiralité

Un objet *chiral*, en particulier une entité moléculaire chirale, n'est pas superposable à son image dans un miroir plan. C'est le cas de chacune des coquilles d'escargots représentées ci-dessous. La chiralité est une caractéristique intrinsèque d'une entité moléculaire liée à

Chapitre I : Chiralité

l'absence de certains éléments de symétrie. Le mot *chiralité* vient du grec *cheir* qui signifie main.

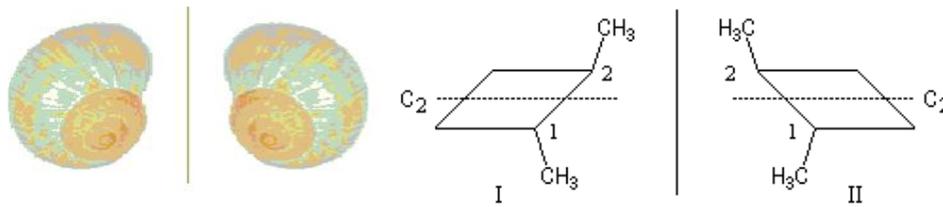


Figure 1 : Principe de la chiralité.

3 Isomérisation

L'isomérisation vient du grec (**isos**=identique, **meros**= partie)[1], elle est dite lorsque deux molécules possèdent la même formule brute et la même masse molaire mais qui ont des formules développées et semi développées différentes, ces molécules sont appelées isomères, ces dernières n'ont pas les mêmes propriétés physiques, chimiques et biologiques[7].

L'isomérisation est répartie en deux axes, principalement, l'isomérisation de constitution et la stéréoisomérisation [7].

3.1 Isomérisation de constitution [7]

Désigne la différence d'enchaînement des atomes, ces isomères ont comme point en commun leurs formules brutes mais pas leurs fonctions chimiques (**voir annexe 1**).

3.2 Stéréoisomérisation [7]

Appelée aussi isomérisation spatiale, elle est scindée en deux parties :

3.2.1 Isomérisation de configuration [7]

Appelées aussi isomérisation stérique, elle concerne l'isomérisation qui résulte uniquement de la position relative des atomes d'une molécule. C'est une notion qui s'applique sur deux molécules possédant les mêmes formules semi développée et développée mais qui ont un arrangement différent dans l'espace. On parle alors **d'énantiomères** ou de **diastéréoisomères**.

Chapitre I : Chiralité

3.2.1.1 *Enantiomères* [5, 6]

Ce sont des molécules stéréo-isomères images l'un de l'autre dans un miroir. Les énantiomères possèdent des propriétés chimiques identiques vis-à-vis d'un réactif non chiral. Par contre, vis-à-vis d'un récepteur chiral, leur réactivité peut être très différente. Cela induit des propriétés biologiques très différentes voire opposées.

Pour qu'une molécule ait un effet biologique, elle doit interagir avec un site récepteur particulier dans l'organisme (membranes, enzymes...). Les systèmes biologiques récepteurs sont eux-mêmes chiraux car ils sont constitués de molécules chirales (protéines, glucides, acides nucléiques...), ils interagissent différemment avec les deux énantiomères d'une molécule chirale externe.

- **Propriétés des énantiomères** [8]

Les propriétés physiques des composés chiraux sont identiques à l'exception de la capacité qu'ils ont de faire tourner le plan de polarisation d'une lumière incidente polarisée. Un des énantiomères fait tourner ce plan de polarisation dans le sens de rotation des aiguilles d'une montre, l'autre dans le sens inverse ; le premier est dit dextrogyre (signe + de la rotation optique), le second lévogyre (signe - de la rotation optique) (**voir annexe 2**).

Un mélange équimolaire des deux types de composés ne possède pas d'activité optique ; on l'appelle un *mélange racémique*.

Il est important de noter qu'il n'est pas possible de relier, par une règle simple, le signe de pouvoir rotatoire à la configuration de la molécule. Un composé dextrogyre peut avoir une configuration R ou S. Si l'on peut établir qu'un composé dextrogyre possède la configuration R au niveau de son carbone asymétrique, alors son énantiomère S sera certainement lévogyre et de même amplitude de pouvoir rotatoire spécifique mais de signe contraire. Par exemple, tous les acides aminés naturels des protéines ont la configuration S (notée L en biochimie) au niveau de leur C*, mais certains sont dextrogyres comme le plus simple d'entre eux, l'alanine, et d'autres lévogyres comme la phénylalanine ou la leucine.

3.2.1.2 *Diastéréoisomères* [7]

Appelés aussi diastéréoisomères, ce sont des stéréo-isomères qui présentent pas une image dans un miroir l'un par rapport à l'autre. La diastéréoisométrie peut être due à des

Chapitre I : Chiralité

différences de configuration ou de conformation à plusieurs sites de la molécule. Il y a des diastéréoisomères **Z** et **E** ou **S-R**, **R-R**, **S-S**, **R-S** (dans le cas où la molécule comporte deux C^*) (**annexe 3**).

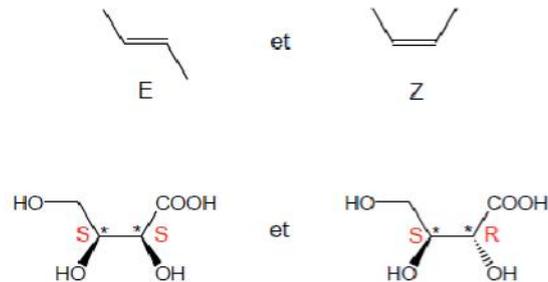


Figure 02 : Diastéréoisomères Z et E.

3.2.1.3 Relation entre énantiomères et diastéréoisomères [5]

Une molécule possédant n carbones asymétriques comporte 2^n stéréo-isomères en relation d'énantiomères et de diastéréoisomères.

Exemple :

Deux C^* possédant des substituants distincts \Rightarrow 4 stéréoisomères :

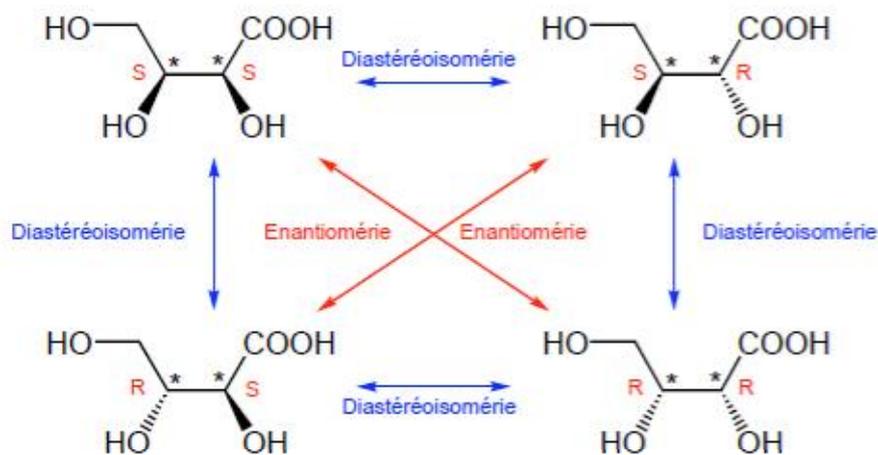


Figure 03 : Relation entre énantiomères et diastéréoisomères

Chapitre I : Chiralité

3.2.2 Isomérisation de conformation [5]

Ce sont des isomères qui ont une même formule développée, ils se différencient que par rotation autour d'une liaison simple sans la rompre (**voir annexe 4**).

4 Chiralité dans la nature

Nous vivons dans un monde chiral, cette propriété existe à toutes les échelles de grandeur. Pour cela, elle joue un rôle primordial dans les processus vitaux des règnes animal et végétal [2].

Les processus métaboliques et les régulateurs des systèmes biologiques sont sensibles à la stéréochimie [2].

Deux formes énantiomères peuvent être distinguées par d'autres propriétés autres que les propriétés optiques telles que le goût et l'odeur. Ainsi, les deux énantiomères de l'asparagine découverts par Puitt en 1866 diffèrent par leur goût : la forme (-) a une saveur « indécise » et la forme (+) a une saveur sucrée. Pasteur suggère que le tissu nerveux intervenant dans la saveur était lui-même dissymétrique [2].

Karl Von Frisch a montré que les abeilles peuvent distinguer les sucres isomères car celles-ci possèdent une sensibilité de goût [2].

La différence d'odeur entre deux énantiomères est plus difficile à établir, tel que la carvone lévogyre qui a une odeur de menthe fraîche tandis que l'odeur de la carvone dextrogyre a une odeur de graines de carvi [2].

De même certaines phéromones, qui attirent les papillons vers leurs femelles grâce à leur odeur, sont chirales [2].

Le (+)-(7R, 8S)-7,8-époxy-2-méthylcotadécane ou disparlure est une phéromone du *Bombyx disparate*, seul l'énantiomère dextrogyre, est actif. L'énantiomère levogyre est dépourvu de l'activité biochimique même si sa concentration est 10^6 fois plus grande que celle de l'énantiomère (+) [1].

Le rôle de la chiralité est très important dans la reconnaissance de l'odeur ce qui présente un intérêt pratique dans les programmes de lutte contre les insectes nuisibles [2], par exemple

Chapitre I : Chiralité

l'utilisation de phéromones sexuelles (l'identification de leur structure et leur synthèse) [1], ce qui permet de conduire les insectes mâles en utilisant une phéromone synthétique et de les détourner des femelles. Cette technique permet de diminuer l'utilisation d'insecticides classiques [1].

La chiralité joue aussi un rôle sur les effets (toxique, mutagène, etc.) de nombreux pesticides. Par exemple, le (R)-(+)-énantiomère de l'herbicide dichlorprop est actif tandis que (S)-(-)-énantiomère est inactif [1].

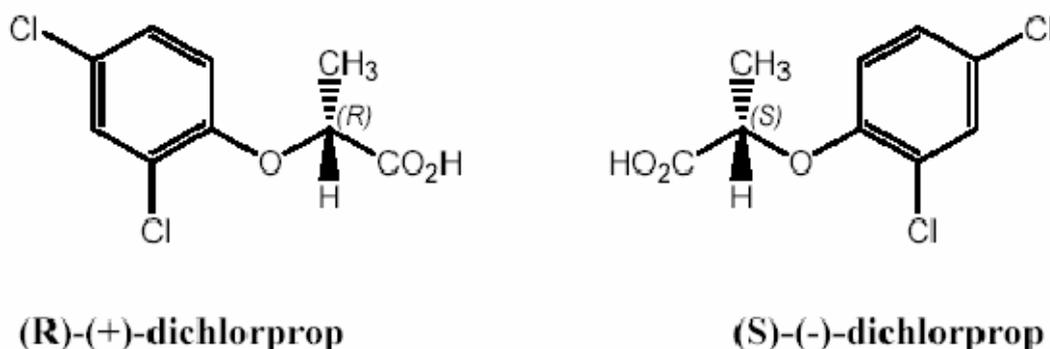


Figure 04 : Enantiomères de l'herbicide du dichlorprop

La L-lysine est un acide aminé qui existe en quantités faibles dans les aliments pour bétail à base de maïs et qui est nécessaire à la croissance des organismes. Elle est utilisée pour améliorer la valeur nutritive du fourrage. Tandis que la D-lysine est inefficace et n'est pas métabolisée par les organismes des animaux [2].

L'aspartame est un dipeptide composé de deux acides aminés l'acide L-aspartique et L-phénylalanine. Il possède un pouvoir sucrant environ 150 fois supérieur à celui du sucre. L'isomère L-L a un goût sucré, alors que les trois isomères, D-D, L-D et D-L, ont un goût amer [2].

De même certains récepteurs olfactifs ont la propriété de distinguer les énantiomères du limonène, l'énantiomère (-) a une odeur de citron et l'énantiomère (+) a une odeur d'orange [1].

5 Chiralité et médicaments

Plus de la moitié des médicaments existant sur le marché sont chiraux, cela veut dire que leur principe actif contient un ou plusieurs centres chiraux (asymétriques) [3].

Chapitre I : Chiralité

Dans de nombreux cas, ils sont prescrits sous forme racémique, car la résolution d'un mélange racémique en énantiomères purs étant très coûteuse. Les énantiomères qui ont des propriétés thérapeutiques identiques ou ceux pour lesquels les propriétés se distinguent uniquement d'un point de vue quantitatif ne présentent pas d'effets néfastes sur la santé [2]. Le problème se pose lorsque les énantiomères possèdent des propriétés qualitatives différentes telles que les propriétés pharmacologiques, toxicologiques, pharmacodynamiques ou pharmacocinétiques [3]. Les systèmes biologiques et les processus métaboliques sont sensibles à la stéréochimie, la surface d'une enzyme ou d'un récepteur possède trois sites différents ce qui permet de distinguer les énantiomères. L'énantiomère qui réagit simultanément avec les trois sites est appelé eutomère [4] (énantiomère dont l'activité est la plus forte [1]), tandis que l'autre qui se lie à moins de trois sites au même temps, est appelé distomère (énantiomère moins actif, inactif ou toxique) [4]. Il y a donc un intérêt évident à identifier les propriétés pharmacologiques et toxicologiques des formes pures du mélange racémique.

Pour les médicaments possédant un centre chiral, différentes situations peuvent se trouver, dans ce cas, quant aux propriétés pharmacologiques et toxicologiques de deux énantiomères :

✚ Enantiomères présentant qualitativement et quantitativement la même activité.

✚ Enantiomères possédant qualitativement le même type d'activité mais d'intensité différente :

C'est le cas de l'anesthésique local, la bupivacaïne, dont l'énantiomère (-) est cependant légèrement plus actif que l'énantiomère (+). L'utilisation de tels composés sous forme racémique ne présente donc aucun inconvénient [2].

✚ Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est inactif: C'est le cas du naproxène, anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) dont seul l'isomère S-(+) est actif [2].

La résolution du mélange racémique, dans ces trois situations, s'avère peu intéressante.

✚ Les deux énantiomères possèdent des activités biologiques différentes : L'isomère R (-) est commercialisé sous le nom de Darvon, il est analgésique. L'isomère S (+), qui est commercialisé sous le nom de Novrad est antitussif [2].

Chapitre I : Chiralité

Lorsque deux énantiomères possèdent des propriétés pharmacologiques différentes, l'usage du mélange racémique peut être maintenu si leurs effets sont bénéfiques sur le plan thérapeutique.

✚ Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est toxique :

C'est le cas du désastre de la thalidomide en 1962 qui est un sédatif léger atténuant les nausées chez les femmes enceintes. On a observé l'apparition des malformations chez les nouveaux-nés [2], depuis cette tragédie, les deux énantiomères ont été séparés. Des études ont montré que l'énantiomère (S) est tératogène [1] et l'énantiomère (R) est inoffensif [2]. Il s'est avéré que même ce dernier se racémise dans le sang. Pour cela, il a été retiré du marché.

Chapitre II : Clopidogrel

Introduction

Le CLP est une molécule qui a été découverte en 1986 par Alain Badorc et Daniel Frehel. Le brevet a été déposé l'année suivante et il a fallût attendre dix ans pour la commercialisation du produit, d'abord sur le marché américain, puis en Europe, puis en France, où la mise sur le marché nécessite des négociations sur le prix avec l'état.

Le CLP est un médicament anti agrégant plaquettaire de la classe des thienopyridine. Son rôle consiste à inhiber sélectivement et de manière irréversible l'activité plaquettaire induite par l'ADP. Il est formulé en un comprimé de 75mg ou 300mg et il est administré par voie orale [11].

Actuellement il est commercialisé par plusieurs industries pharmaceutiques dans le monde sous différents noms tels que clopix®, plagrel® et clavix®.

1 Caractéristiques du CLP [9]

- **Dénomination commune** : bisulfate de clopidogrel
- **Nom chimique** :
 - ✓ Sulfate (1:1) de (*S*)- α -(2-chlorophényl)-6,7-dihydrothiéo[3,2-*c*]pyridine-5(4*H*) acétate de méthyle.
 - ✓ (+)-(*S*)-2-(2-chlorophényl)-2-(6,7-dihydrothiéo [3,2-*c*]pyridin-5(4*H*)-yl) ethanoate de méthyle (IUPAC)[10]
- **Formule moléculaire** : $C_{16}H_{16}ClNO_2S$
- **Formule développée** :

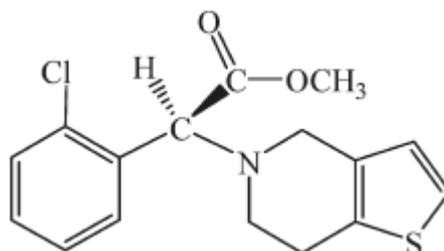


Figure 5 : CLP [10]

- **Masse moléculaire** : $321,822 \pm 0,022 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Chapitre II : Clopidogrel

- **Propriétés physicochimiques :**

Le bisulfate de clopidogrel est une **poudre blanche à blanc cassé**.

- **Solubilité**

Le bisulfate de CLP est pratiquement insoluble dans **l'eau à pH neutre**, mais facilement soluble dans **l'eau à pH 1**. Il est facilement soluble dans le méthanol, assez soluble dans le chlorure de méthylène et il est **pratiquement insoluble dans l'éther éthylique**.

- **Pouvoir rotatoire : +56** degrés environ.

- **pKa = 4,55.**

- **pH et effet sur l'absorption des UV**

- **À pH 2**

Absorbance UV max. = **271 et 278 nm.**

Absorbance UV min. = **259 et 275 nm.**

- **À pH 7**

Absorbance UV max. = **269 et 276 nm.**

Absorbance UV min. = **266 et 274 nm.**

- **À pH 9**

Absorbance UV max. = **269 et 276 nm.**

Absorbance UV min. = **266 et 274 nm.**

- **Coefficient de partage :** Environ **3,9** à **pH 7,4** en milieu **eau/octanol**.

- **Point de fusion :** Environ **176,8 °C** par calorimétrie différentielle à balayage.

2 Mécanisme d'action et pharmacodynamie [9]

Le rôle des plaquettes dans la physiopathologie de l'athérosclérose et des événements athérombotiques est bien connu. L'administration prophylactique de longue durée des antiagrégants plaquettaires s'est avérée bénéfique dans la prévention des accidents ischémiques cérébraux, des infarctus du myocarde (IM), de l'angine de poitrine instable, des maladies artérielles périphériques et des décès d'origine vasculaire. Elle réduit en outre la nécessité de recourir au pontage ou à l'angioplastie chez les patients exposés à un risque élevé de souffrir de tels événements, y compris les patients qui présentent une athérosclérose établie ou des antécédents d'athérombose.

Chapitre II : Clopidogrel

Le CLP est un pro-médicament, dont l'un des métabolites peut inhiber l'agrégation plaquettaire. Le CLP doit subir une transformation par des enzymes du cytochrome P450 (CYP450) pour produire le métabolite actif qui inhibe l'agrégation plaquettaire. Le métabolite actif du CLP inhibe sélectivement la liaison de l'adénosine di phosphate (ADP) à son récepteur plaquettaire P2Y₁₂ ainsi que l'activation du complexe glycoprotéine IIb-IIIa induite par l'ADP qui s'ensuit, entraînant ainsi l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Le métabolite inhibe également l'agrégation plaquettaire induite par des agonistes autres que l'ADP en bloquant l'amplification de l'activation plaquettaire induite par l'ADP libérée.

Étant donné que le métabolite actif est formé par les enzymes du CYP450, dont certaines sont polymorphes ou susceptibles d'être inhibées par d'autres médicaments, ce ne sont pas tous les patients qui bénéficieront d'une inhibition satisfaisante de l'agrégation plaquettaire.

Le CLP n'inhibe pas l'activité de la phosphodiesterase. L'acide acétylsalicylique (AAS) inhibe la voie métabolique de la cyclo-oxygénase, empêchant la production de prostaglandine et, par conséquent, la synthèse de la thromboxane A₂, laquelle stimule l'agrégation plaquettaire. Le CLP agit sur le récepteur de l'ADP alors que l'AAS agit sur un autre récepteur : il y a donc inhibition de voies d'activation et d'agrégation plaquettaire différentes. Il y a par conséquent un potentiel de synergie entre les 2 agents.

Le CLP agit en modifiant de manière irréversible le récepteur plaquettaire de l'ADP. Par conséquent, les plaquettes exposées au CLP sont affectées pour le reste de leur durée de vie (**environ 7 à 10 jours**) et la vitesse de retour à la fonction plaquettaire normale dépend donc de la rapidité de renouvellement des plaquettes. Une seule dose ne suffit cependant pas à atteindre l'effet thérapeutique désiré. On a noté une inhibition de l'agrégation plaquettaire statistiquement significative, proportionnelle à la dose, 2 heures après l'administration d'une dose orale unique de CLP. L'administration de doses répétées de 75 mg par jour entraîne, dès le premier jour, une inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. L'état d'équilibre est atteint entre le troisième et le septième jour. À l'état d'équilibre, le taux moyen d'inhibition associé à une dose de 75 mg/jour se situe entre 40 % et 60 %. Le taux d'agrégation et le temps de saignement reviennent peu à peu aux valeurs initiales dans les 5 à 7 jours après l'arrêt du traitement. La corrélation précise entre l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la prolongation du temps de saignement et la prévention des événements athérotrombotiques n'a pas été établie.

3 Pharmacocinétique [9]

Les principaux paramètres pharmacocinétiques du CLP sont présentés au tableau suivant :

Tableau 1 : La concentration maximale et le temps de demi-vie du CLP en Dose unique moyenne [9].

	C_{\max}	$t_{1/2}$ (h)
Dose unique moyenne	2,2 à 2,5 ng/mL	6h à 8h

3.1 Absorption [9]

Après l'administration orale d'une dose unique ou de doses répétées de 75 mg par jour, le CLP est rapidement absorbé dans l'organisme. La concentration plasmatique maximale (C_{\max}) moyenne du CLP sous forme inchangée (qui est d'environ **2,2 à 2,5 ng/ml** après l'administration orale d'une dose unique de 75 mg) est atteinte dans les **45 min** suivant la prise du médicament.

L'absorption atteint **50 %** au moins, comme en témoigne l'excrétion urinaire des métabolites du CLP. L'administration de **PLAVIX®** avec les repas ne modifie pas la biodisponibilité du CLP de façon significative, comme l'indique la pharmacocinétique du principal métabolite circulant.

3.2 Distribution [9]

In vivo, le CLP et son principal métabolite circulant (inactif) se lient de manière réversible aux protéines plasmatiques humaines (à **98 %** et à **94 %**, respectivement). In vivo, la liaison n'est pas saturable jusqu'à une concentration de 100 µg/ml.

Chapitre II : Clopidogrel

3.3 Métabolisme [9]

Le CLP est inactif *in vivo* et *in vitro* mais une fois qu'il est administré dans l'organisme il devient actif.

Le CLP se métabolise selon deux voies :

La première est assurée par des estérases en produisant un dérivé acide carboxylique inerte par hydrolyse (**85%** des métabolites circulants) et la seconde est assurée par des multiples cytochromes P450. Le CLP est transformé d'abord en un métabolite intermédiaire en suite en un métabolite actif, thiol de CLP ; *in vitro*, ce métabolisme est médié par les iso enzymes **CYP3A4**, **CYP2C19**, **CYP1A2** et **CYP2B6**. Le métabolite actif thiol, qui a été isolé *in vitro*, se lie rapidement et irréversiblement aux récepteurs plaquettaire, inhibant ainsi l'agrégation plaquettaire.

Une fois l'administration d'une dose d'attaque de 300mg de CLP la C_{max} du métabolite est deux fois plus élevée que celle qu'on observe après administration d'une dose d'entretien de 75mg par jour pendant 4 jours, la C_{max} est obtenue de **30 à 60 min** environ après la prise du médicament.

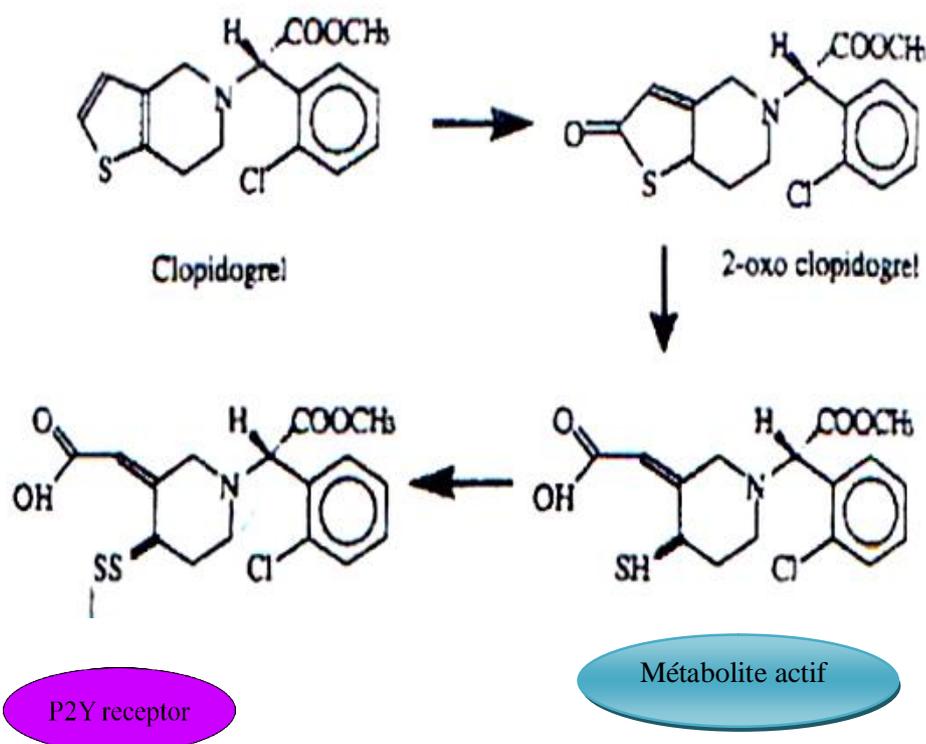


Figure 6 : Métabolismes du CLP et la fixation sur le récepteur P2Y [12].

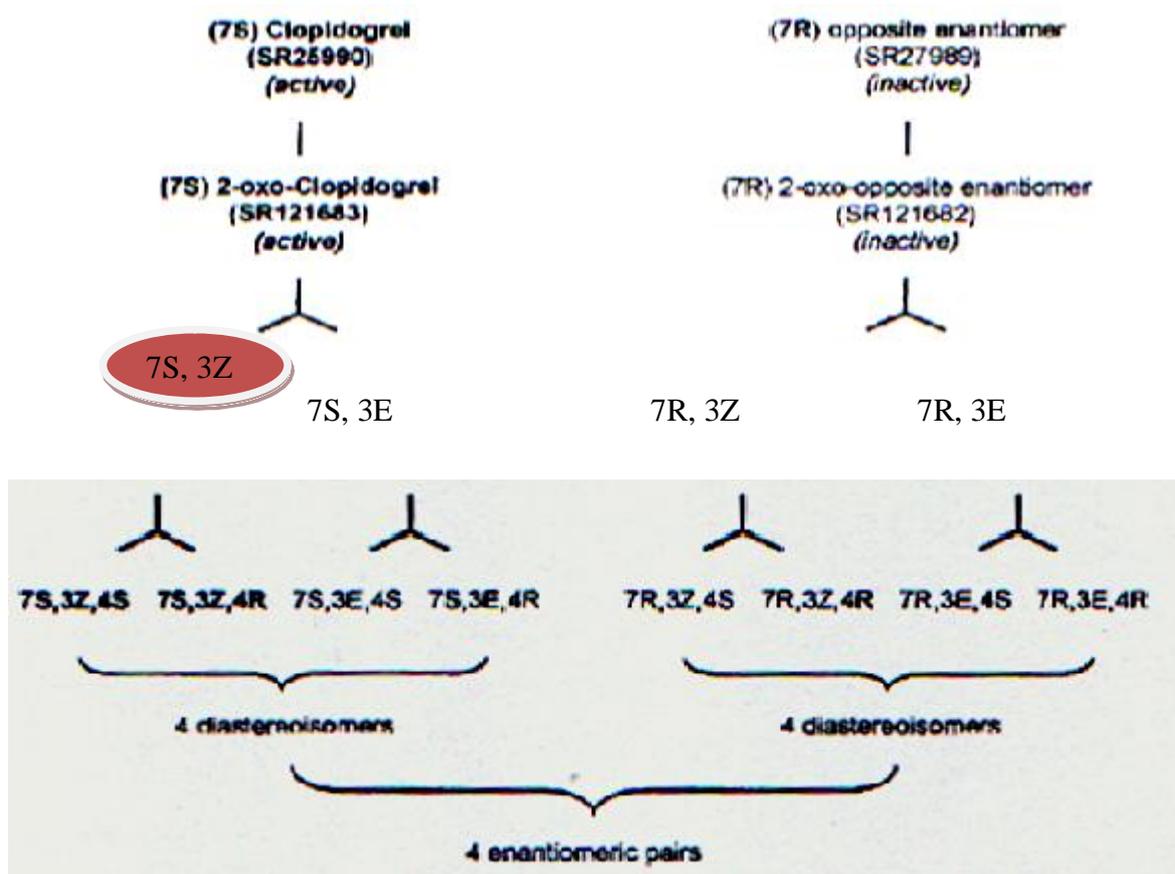


Figure 7: Métabolisme du S et R dans l'in vivo en quatre diastéreoisomères [12]

3.4 Excrétion [9]

Après 5 jours suivant l'administration du CLP marqué par ^{14}C à des sujets humains 50% de produit est excrété dans l'urine et environ 46% dans des sels.

Après l'administration d'une dose orale unique de 75 mg la demi-vie du CLP est d'environ 6 à 7 heures et la demi-vie d'élimination du principal métabolite circulant (inactif) est de 8 heures après administration d'une dose unique ou de doses répétées. 2% du radio marqueur est fixé par une liaison covalente aux plaquettes, avec une demi vie de 11 jours.

Chapitre II : Clopidogrel

4 Le CLP et chiralité

Le CLP est un médicament synthétisé par voie chimique à partir du **Methyl-2-(S)-(+)-(2-chlorophenyl) amino acetate**, **Thiophene-2-ethyl-4-toluene sulphonate** [10] et à partir d'autres composés. Les produits de synthèse sont dits énantiomères R et S, ils sont présentés dans la figure suivante :

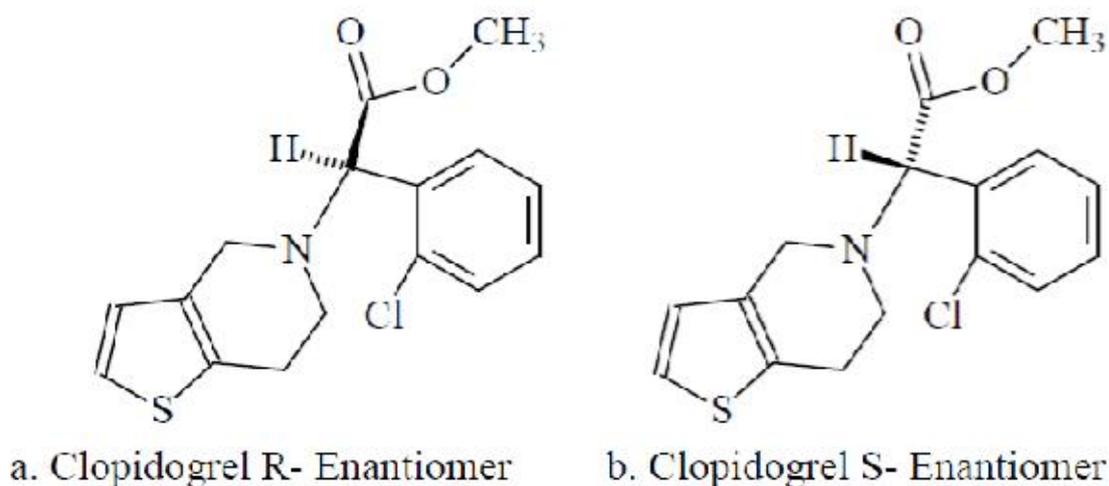


Figure 8: L'énantiomères S et R du CLP [13]

D'après des études pré clinique et clinique, seul l'énantiomère S présente une activité anti thrombique, alors que l'énantiomère R est exempté de cette activité anti thrombitique [14] mais il présente une toxicité à des doses élevées chez les animaux, cette différence est due à l'effet de la chiralité de ces molécules, par conséquent les S et R CLP doivent être séparés. Une fois que S-CLP est administré dans l'organisme, il subit plusieurs métabolismes qui donnent lieu à quatre diastéréoisomères mais un seul des quatre est actif [12]. Donc la chiralité joue un rôle très important sur l'activité chimique et biologique du CLP.

1 Méthodes chromatographiques

La chromatographie, terme d'origine grec : Khromatos (couleur) et graphos (écrire), est une technique d'analyse qualitative et quantitative utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants dans des mélanges complexes, basée sur les différences d'affinité des constituants à l'égard de deux phases : l'une stationnaire fixe (solide ou liquide) et l'autre mobile (liquide ou gazeuse).

Les constituants du mélange sont entraînés à travers la PS par le flux de la PM. Ils sont séparés grâce à leurs vitesses de migration à travers la PS.

1.1 Classification des techniques chromatographiques

1.1.1 Selon la nature de la phase mobile

- La PM est un gaz : chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou vapeur (CPV).
- La PM est un liquide : chromatographie en phase liquide (CPL) (chromatographie liquide à haute performance HPLC).
- La PM est un fluide supercritique : chromatographie en phase supercritique (CPS).

1.1.2 Selon la nature des deux phases mobile et stationnaire

Tableau 02: Type de chromatographie selon la nature de PM et PS.

Type de chromatographie	PM	PS
Chromatographie liquide/solide (adsorption, exclusion ou échange d'ions)	liquide	solide
Chromatographie liquide/liquide (partage)	liquide	Liquide
Chromatographie gaz/liquide (partage)	gaz	Liquide
Chromatographie gaz/solide	gaz	Solide

Chapitre III : Méthodes d'analyse

1.1.3 Selon la nature du phénomène

Tableau 03: Type de chromatographie selon la nature du phénomène.

Type de chromatographie	PM	PS
Adsorption	Gaz ou liquide	Solide adsorbant comme le gel de silice
Ionique	Solution tampon aqueuse	Solide (polymère ionisé ou ionisable dont les ions sont échangeables avec la phase mobile.
Partage	Gaz ou liquide	Liquide immobilisé sur un solide par imprégnation ou par greffage par des liaisons chimiques.
Exclusion	Aqueuse : chromatographie de filtration sur gel. Organique : chromatographie de perméation sur gel	Solide poreux
Chirale	Gaz ou liquide	chirale

1.1.4 Selon le type d'application

Tableau 04: Type de chromatographie selon le type d'application.

Type de chromatographie	Application
Chromatographie préparative	Séparation des constituants d'un mélange
Chromatographie analytique	Séparation, identification et/ou dosage des impuretés.

1.1.5 Selon le support de la phase stationnaire

Tableau 05: Type de chromatographie selon le support de la PS.

Type de chromatographie	Support de la PS
Chromatographie sur colonne	Colonne (tube)
Chromatographie planaire : <ul style="list-style-type: none">○ Sur couche mince (CCM)○ Sur papier	<ul style="list-style-type: none">○ Plaque de verre, d'aluminium ou de matière plastique.○ Feuille de cellulose imprégnée de liquide (eau).

1.2 Chromatographie en phase liquide (CPL)

C'est une méthode de séparation et d'analyse des composés à l'état liquide. Elle est très utilisée dans le domaine de la chimie analytique [15]. Elle présente des inconvénients comme la lenteur des séparations liée aux faibles vitesses d'élution en raison de l'efficacité médiocre des colonnes, l'absence de détecteurs et la nécessité d'utiliser de grandes quantités de l'échantillon. Elle peut être classée selon la nature du phénomène mis en jeu (**annexe 5**).

1.2.1 La chromatographie liquide à haute performance HPLC

La chromatographie liquide à haute performance est une forme moderne des méthodes chromatographiques [16]. Cette technique est utilisée pour palier aux inconvénients de la (CPL), elle permet d'obtenir des vitesses d'élution élevées (ordre de grandeur des durées 5 min à 1 h pour une HPLC et 1 h à 20 h pour une LC « ancienne » [16], et ce par la mise en œuvre d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient le débit du liquide constant et par l'amélioration de l'efficacité des colonnes en uniformisant la granulométrie du support et en réduisant la grosseur des grains [15].

1.2.2 Appareillage de l'HPLC

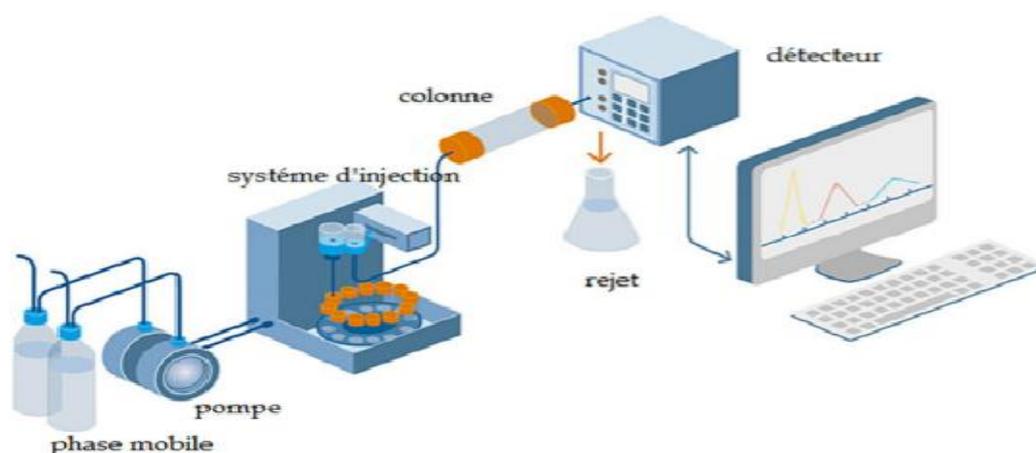


Figure 9 : Composants d'un chromatographe liquide à haute performance [17]

1.2.2.1 Réservoirs de phase mobile

On utilise des réservoirs en verre ou en acier inoxydable contenant chacun au moins 500ml de solvant [15]. Des gaz ambiants comme l'oxygène, peuvent être dissous dans les solvants, former des bulles dans la colonne et créer des perturbations dans la détection (élargissement des pics). De même des poussières en suspension peuvent perturber les séparations et gêner le bon fonctionnement des pompes et des détecteurs. Il est donc souhaitable de dégazer et de filtrer les solvants [19].

1.2.2.2 Phase mobile [18]

Les solvants recommandés pour HPLC doivent être dégazés et filtrés avant usage. Le dégazage est effectué par ultrasons ou par barbotage d'un gaz inerte chimiquement par exemple azote, argon, hélium. Malgré la haute qualité des solvants, la filtration sur filtre spécial (0,4 μm) est recommandée pour empêcher l'obstruction éventuelle des orifices par les particules. Le choix du solvant constitue habituellement la partie la plus difficile car il dépend du type de chromatographie à appliquer. Il faut utiliser en priorité les mélanges suivants: - méthanol – eau, acétonitrile – eau, tétrahydrofurane – eau.

On fait d'abord les essais avec une forte proportion d'eau, puis on augmente progressivement la proportion en solvant organique jusqu'à obtention d'une bonne séparation. Avec un mélange de solvants de composition constante, il n'est pas toujours possible d'obtenir une bonne résolution (**annexe 6**) et une durée d'analyse raisonnable.

Chapitre III : Méthodes d'analyse

Pour concilier les deux, on peut opérer par élution graduée, c'est à dire par augmentation graduelle du pourcentage de solvant ayant la force d'élution la plus élevée. Il existe sur le marché des appareils programmés permettant d'obtenir des gradients d'élution.

1.2.2.3 Pompe

Elle constitue la partie la plus délicate car elle doit maintenir une pression élevée jusqu'à 420bars [18]. Elle doit permettre d'obtenir un débit suffisant jusqu'à 10ml/min pour les chromatographies à grandes vitesses avec des bonnes exactitudes et reproductibilité.

Les pompes les plus utilisées, actuellement, sont :

- ✓ **Les pompes dites « seringues »** où la PM est poussée par piston qui se déplace à une vitesse constante grâce à l'action d'une vis sans fin.
- ✓ **Les pompes à piston** à mouvement alternatif [16], comprennent une petite chambre cylindrique qui se vide et se remplit en fonction du mouvement de va-et-vient du piston [15].

La pompe est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant [18].

1.2.2.4 Injecteur

On peut distinguer :

- ✓ **Injecteur à dépôt direct** [16] : l'échantillon est injecté à l'aide d'une seringue à travers un septum en élastomère. Cette procédure n'est pas très reproductible, actuellement, elle n'est plus utilisée.
- ✓ **Injecteur à boucle externe** [16] : c'est la procédure la plus utilisée actuellement, car elle permet de choisir les volumes d'échantillon à injecter compris entre 10 et 100 µl. Ce système est très reproductible.

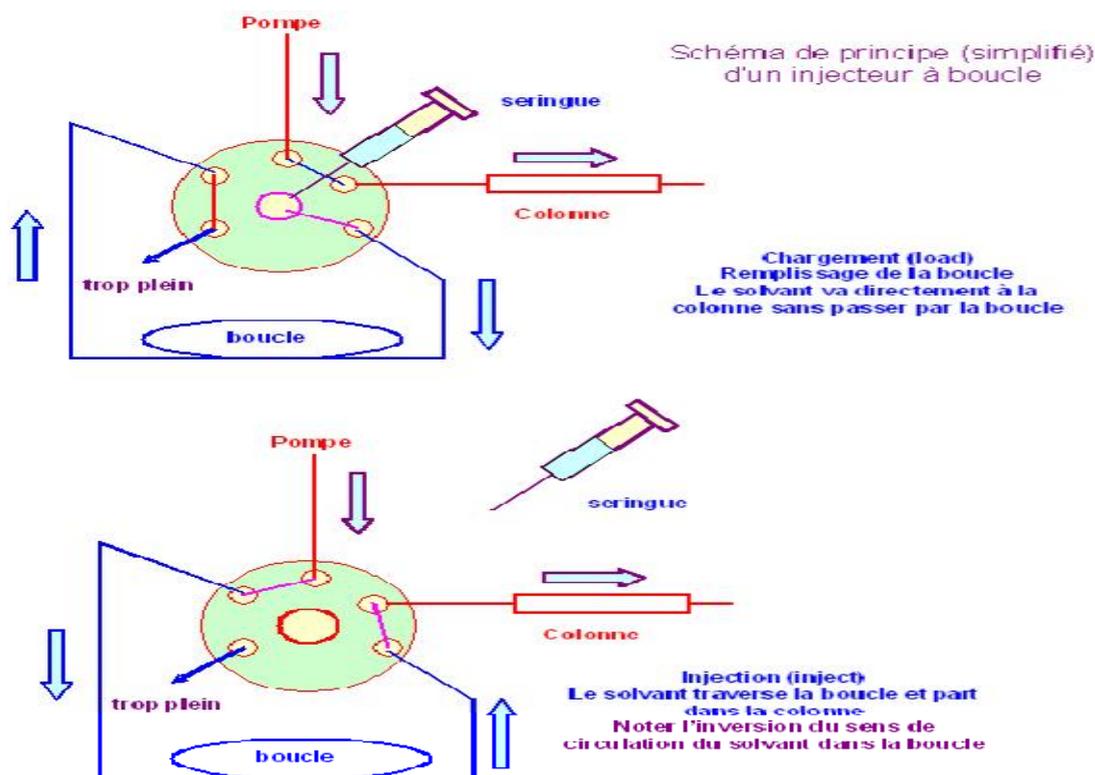


Figure 10: schéma de fonctionnement d'une boucle d'échantillonnage [20].

1.2.2.5 Colonne

C'est la partie active du système. La colonne est un cylindre calibré généralement en acier inoxydable parfois doublé d'un matériau inerte (verre ou plastique spéciaux). La PS est maintenue entre deux disques frittés [20].

La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 μm . Il existe des micro colonnes à haute performance qui ont un diamètre de 1 à 4,6 mm et une longueur de 3 à 7,5 cm.

Ces colonnes qui sont remplies de particules de 3 à 5 μm , présentent les avantages de la rapidité et d'une consommation minimale de solvant. Cette dernière propriété est d'une importance considérable car les solvants de haute pureté pour la HPLC sont très coûteux [15]. La colonne est souvent précédée, pour augmenter sa durée de vie, d'une précolonne dite colonne de garde, courte de 1cm, qui retient les composés indésirables. On change périodiquement cette précolonne, bien qu'il soit par ailleurs conseillé de faire passer les échantillons avant l'analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5 μm [18].

L'efficacité d'une colonne chromatographique s'évalue à partir de l'un des termes suivants H ; Hauteur Equivalente d'un Plateau Théorique (HEPT) et N : Nombre de plateaux théoriques (annexe 7).

Il existe des colonnes dites **chirales** et des colonnes **achirales**, elles sont choisies en fonction de la nature des constituants du mélange à doser ou à séparer, le plus souvent, les transformations chimiques fournissent des mélanges racémiques, dans un grand nombre de situation, il est nécessaire d'extraire un seul des énantiomères. La solution consiste à combiner le mélange racémique avec une espèce chimique chirale qui existe sous forme d'un seul énantiomère, puis à profiter de la différence de propriétés entre les diastéréoisomères formés.

1.2.2.6 Phase stationnaire [18]

Les PSs en HPLC sont très variées: On peut travailler par échange d'ions ou par perméation sur gel d'où les nombreuses possibilités d'application de la méthode. La silice est l'absorbant choisi lorsqu'on désire effectuer une chromatographie solide-liquide. Elle s'applique bien aux composés organiques de masse inférieure à 2000 et à la séparation de composants renfermant des groupements fonctionnels différents. Par contre la séparation est difficile si les composés à dissocier sont peu polaires et elle requiert une grande quantité de solvant organique. La chromatographie de partage est beaucoup plus usuelle, d'autant que le développement de PSs greffées peu polaires autorise l'emploi de PMs aqueuses dans lesquelles le solvant organique est en faible proportion. Ces phases sont formées par silanisation des groupements hydroxyle de la silice. Dans ce cas la chromatographie est dite à polarité de phase inversée (PI) car plus le solvant est polaire (proportion élevée en eau), moins il entraîne les substances organiques peu polaires: Ces dernières sont davantage retenues par la phase stationnaire faiblement polaire.

1.2.2.7 Détecteur

Le détecteur est élément essentiel d'un système chromatographique HPLC puisqu'il permet de suivre continuellement la séparation et de mesurer la concentration instantanée des solutés. Il doit être fidèle, sensible, stables, linéaires. Toutefois, il n'existe pas de détecteur universel comme en CPG mais seulement des détecteurs spécifiques à l'exception du spectromètre de masse [16].

1.2.2.7.1 Spectrophotomètre UV-Visible [16]

C'est le plus couramment utilisé. Les limites de ce système sont les absorptions propres du solvant et du soluté. La réponse dépend essentiellement du coefficient d'absorption

Chapitre III : Méthodes d'analyse

molaire du soluté. Dans les cas les plus favorables, la quantité minimale détectable est de l'ordre du nanogramme. La réponse du détecteur suit la loi de Beer –Lambert.

Il existe plusieurs types d'appareils :

- ✓ à **longueur d'onde fixe** : $\lambda=254$ nm.
- ✓ à **longueurs d'onde variables** : de 200 à 700 nm
- ✓ à **barrette de diodes** : qui donnent la valeur simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre (méthodes spectrales). On obtient un chromatogramme en trois dimensions. Ce type de détecteurs est très efficace pour rechercher les impuretés dans les matières premières pharmaceutiques.

1.2.2.7.2 Détecteur à fluorescence

Ce type de détecteur est très sensible (100 à 1000 fois plus que le détecteur U.V) et très sélectif [20], mais son utilisation est limitée uniquement aux solutés fluorescents [16]. On peut étendre son champ d'application en transformant, par une réaction appropriée, une substance non fluorescente en une autre qui le sera. Environ 15% des composés chimiques sont naturellement fluorescent ce qui restreint quelque peu son utilisation. Ce type de détecteur est utilisable en mode gradient [20].

1.2.2.7.3 Détecteur réfractométrique

Il mesure la différence d'indice de réfraction entre la PM et la PM avec l'échantillon (l'effluent de la colonne). Il nécessite une température régulée à 0,01°C, car les indices de réfraction varient avec la température [19].

Ce détecteur exclut les variations de la composition de la PM ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur [20].

1.2.2.7.4 Détecteurs d'absorption dans l'infrarouge [19]

Il existe deux types de détecteurs d'absorption dans l'infrarouge :

- De 2.5 à 14.5 μm (4000 à 690 cm^{-1})
- à transformée de Fourier

Ces deux types de détecteurs ont des cellules avec fenêtres en chlorure de sodium ou fluorure de calcium. Longueur de cellule = 0,2 à 1,0 mm Volume de cellule= 1,5 à 10 μL .

Toutefois les larges bandes d'absorption de l'eau et des alcools empêchent l'utilisation de ce détecteur infrarouge dans de nombreux cas.

1.2.2.7.5 Détecteurs électrochimiques [16]

Ils sont réservés aux solutés qui sont électroactifs, dérivés nitrés, hydroquinones, amines aromatiques, phénols, etc. On distingue :

- ✓ Des **détecteurs coulométriques** : La substance électroactive est entièrement électrolysée. Ce système nécessite l'emploi d'une électrode de grande surface.
- ✓ Des **détecteurs ampérométriques** : La substance électroactive n'est que partiellement électrolysée. Ce système nécessite l'emploi de trois électrodes afin de minimiser les problèmes de chutes ohmiques liés à la présence des solvants d'élution souvent peu conducteurs.
- ✓ Des **détecteurs conductimétriques** : Il est utilisé pour les chromatographies dites ioniques.

1.2.2.7.6 Détecteurs par spectrométrie de masse [19]

Le couplage CLHP / SM est plus difficile à réaliser qu'avec la CPG car il faut éliminer le solvant d'élution. On peut:

- réaliser une vaporisation sélective du soluté
- utiliser des microcolonnes (Longueur=10 cm, diamètre intérieur=1mm) à faible débit (quelques $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) et un volume d'injection de $\sim 1\mu\text{l}$ qui permettent d'introduire la totalité de l'effluent chromatographique dans le spectromètre de masse. On peut travailler en nanochromatographie.

Il existe des techniques de **multidétection avec couplage [19]** :

- ❖ Spectroscopie UV / réfractométrie.
- ❖ Réfractométrie/diffusion de la lumière.
- ❖ Réfractométrie/viscosimétrie.

1.3 Chromatographie et la chiralité

La chromatographie chirale est une technique de chromatographie qui consiste en la formation de liaisons non covalentes entre les énantiomères du substrat et la PS chirale donnant des diastéréoisomères ayant des affinités de liaisons différentes.

Une séparation basée sur une HPLC utilisant une colonne chirale qui existe sous une seule forme énantiomère, les deux énantiomères à séparer (le mélange racémique) vont interagir différemment avec cette dernière (les interactions seront "diastéréoisomères"), le pic de l'un des deux énantiomères apparaîtra avant l'autre s'il interagit moins que l'autre. Cependant, s'il

s'agit d'une séparation basée sur une colonne achirale, les deux énantiomères à séparer vont interagir de la même façon avec celle-ci, un seul pic qui apparaîtra et leur séparation n'est donc pas possible.

2 Méthodes électrophorétiques[16]

Se basent sur le mouvement d'une espèce chargée sous l'influence d'un champ électrique au sein d'un électrolyte stationnaire. Ces méthodes sont destinées pour la séparation des composés chargés sous l'action d'un champ électrique, elles sont applicables aussi bien aux ions simples qu'aux macromolécules. Parmi ces méthodes les plus utilisées en séparation chirale sont la chromatographie micellaire électrocinétique (**CMEC**) et l'électrophorèse capillaire de zone (**ECZ**). Plus récemment, l'électrochromatographie capillaire (**ECC**) a été développée.

2.1 Chromatographie micellaire électrocinétique [16]

Cette méthode permet la séparation des espèces neutres dans des conditions similaires à celles utilisées pour la séparation des cations et anions utilisant un flux électro-osmotique. Elle s'intéresse également pour des espèces chargées de mobilité voisine. Les espèces à séparer vont se partager entre la phase micellaire et la solution en fonction de leur hydrophobicité. Dans cette technique, la séparation repose sur la combinaison de deux paramètres, la charge et l'hydrophobicité.

Grâce au pouvoir de solubilisation des micelles, des échantillons complexes comme l'urine ou le plasma peuvent être directement injectés dans le capillaire.

2.2 Chromatographie capillaire [16]

L'ECC est une technique de séparation mettant en œuvre les mécanismes de l'électrophorèse capillaire et de la chromatographie en phase liquide. Le capillaire est rempli d'une PS et la PM est hydrodynamique. Elle se déplace sous l'effet du champ électrique, le système de pompe n'est donc plus nécessaire pour assurer le déplacement du liquide. Le diamètre des particules peut être encore plus faible améliorant ainsi la résolution des mélanges. Les particules micrométriques composant la PM peuvent être remplacées par des phases monolithes préparées à partir de méthyltriméthoxysilane.

Les espèces neutres vont se partager comme en LC entre la PS et la PM alors que les séparations des espèces chargées combinent les deux phénomènes de partage et de migration électrophorétique.

2.3 Électrophorèse capillaire de zone [16]

C'est la méthode la plus simple, la séparation des ions et des espèces neutres s'effectue sous l'action de deux migrations électrophorétique et électroosmotique. Les cations sont séparés les premiers, puis l'ensemble des espèces neutres avec la même vitesse et enfin en dernier les anions.

2.4 Appareillage [16]

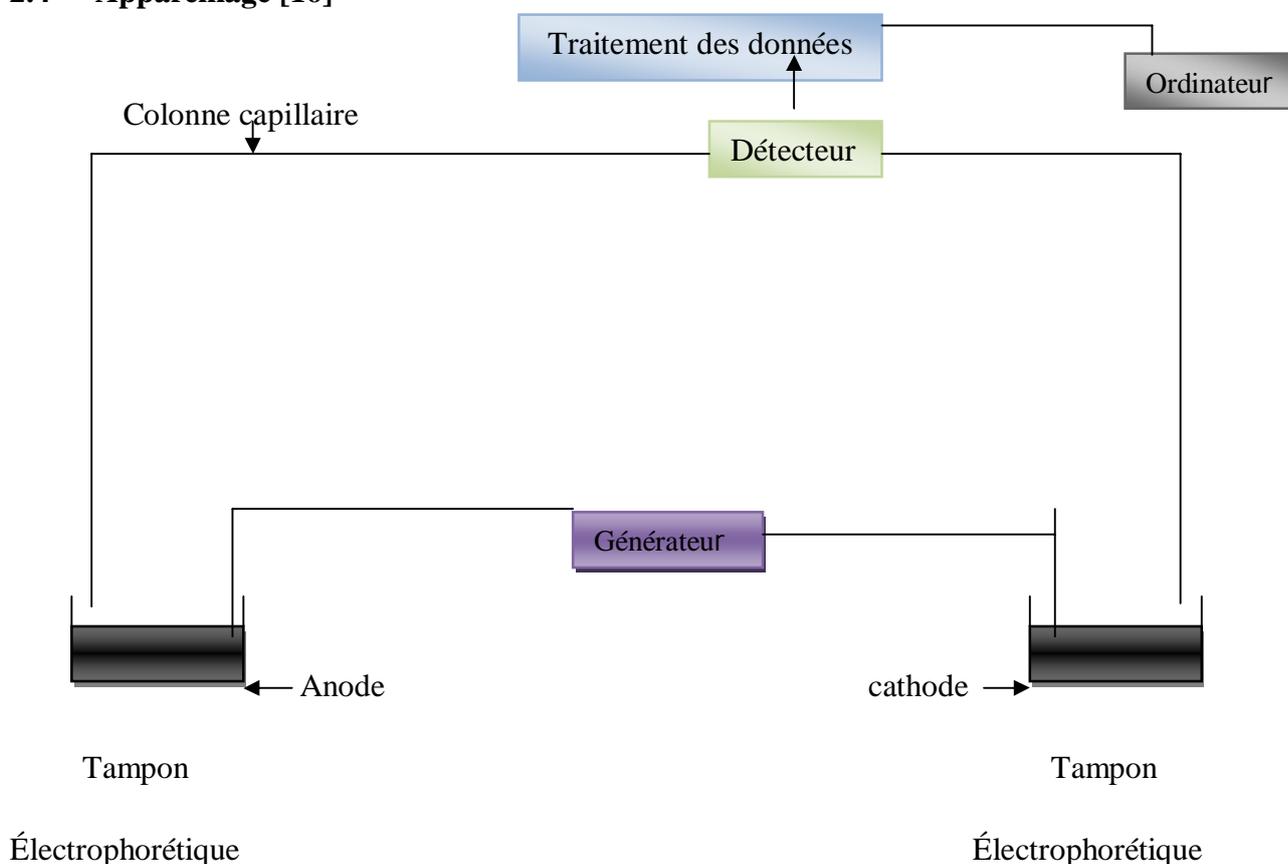


Figure 11 : Appareil d'électrophorèse capillaire [16].

2.4.1 Colonne capillaire [16]

Les colonnes capillaires sont en général en silice fondue de polyamide. Elles présentent un diamètre intérieur de 25 à 100 μ m et une longueur de 25 à 100 cm. Elles sont remplies d'une solution tampon électrophorétique.

2.4.2 Les systèmes d'injection [16]

Le volume introduit dans la colonne capillaire n'excède pas 1 à 2 μl pour éviter les problèmes d'élargissement des pics.

2.4.3 Le détecteur [16]

La détection peut s'effectuer à travers la colonne capillaire ou à l'aide d'une interface, Il se place sur la colonne capillaire. Les types des détecteurs utilisés sont du même type que ceux cités dans la HPLC.

2.4.4 Tampon électrophorétique

Il existe un nombre très varié de tampon chacun est propre à une méthode électrophorétique donnée, tel que le borate de sodium utilisé en ECZ avec un gel d'agarose à 3 %.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

D'après la littérature le CLP est un médicament qui est analysé par plusieurs méthodes ; HPLC [13], IR [21], UV-visible [24] et l'électrophorèse [29], [30] etc. Mais l'HPLC reste la méthode la plus utilisée pour l'analyse du CLP car elle permet de détecter mais aussi de séparer les principales impuretés qui lui sont associées.

Ce principe actif possède deux énantiomères, l'énantiomère- S est actif tandis que l'énantiomère-R est inactif. Dans notre cas, les échantillons à analyser sont présents sous une seule forme énantiomérique, qui est la forme S-CLP.

L'USP propose une méthode HPLC utilisant une colonne chirale qui permet de détecter les impuretés A, B et C.

La méthode monographiée par l'USP n'est pas capable de séparer toutes les impuretés associées au CLP, cela est dû au fait que cette méthode est basée sur une colonne chirale et que les impuretés ne sont probablement pas toutes chirales, c'est pour cette raison que la méthode achirale a été choisie [13].

De plus, une colonne chirale présente des inconvénients, tels qu'une durée de vie courte et un coût élevé. Contrairement à celle-ci, la colonne dite achirale présente une durée de vie plus longue et un coût plus faible.

Pour cela nous allons réaliser une étude expérimentale qui consiste en une méthode HPLC en PI utilisant une colonne achirale C₁₈ où trois échantillons plavix©, plagrel®, et le S-CLP(API) seront analysés.

Le problème posé, cette colonne est-elle capable de d'identifier le CLP avec les principales impuretés décrites par l'USP, y aura-t-il d'autres impuretés qui vont apparaître ?

1 Matériel

1.1 Matières premières et Produits finis

Principe actif (utilisé comme témoin) [18]

CLP bisulfate C₁₆H₁₆ClNO₂S.H₂SO₄ synthétisé par le groupe Ind.swift (industrie pharmaceutique indienne incorporé en 1986).

Chapitre IV : Matériels et méthodes

🚩 PLAVIX® princeps [11]

Est un comprimé pelliculé à 75mg; fabriqué par le groupe pharmaceutique Français Sanofi Aventis. Il est constitué d' :

- ✓ API: clopidogrel bisulfate (matière première)
- ✓ Excipients: (mannitol(E421), macrogol 6000, cellulose microcristalline, huile de ricin hydrogénée, hydropropyl cellulose faiblement substituée.). Enrobage: hypromellose (E464), lactose, triacetine (E1518), dioxyde de titane (E171), oxyde ferrique rouge (E172) et d'un agent polissant (cire carnauba).
- ✓ Conditionnement primaire et secondaire : une boîte en carton contenant deux blisters (PVC /aluminium) comportant 28comprimés chacun.

Les excipients à effet notoire sont : lactose : **3mg/comprime de 75mg** et huile de ricin hydrogénée **3,3mg/comprime de 75mg**.



Figure 12: PLAVIX® 75mg (boîte de 28 CP).

🚩 PLAGREL® générique en Algérie [19]

Est un comprimé enrobé à 75mg qui est fabriqué par le laboratoire pharmaceutique EL KENDI (installé en Algérie). Il est constitué de:

API: clopidogrel bisulfate (matière première) selon l'USP

Les excipients ; avicel, manitol, hydroxypropylcellulose, polyéthylène, glycol, croscamellose sodique, stéaryle fumarate de sodium, opadry, E172, siméthicone

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Conditionnement primaire et secondaire: une boîte en carton contenant deux blisters (PVC / aluminium) de 28 comprimés chacun.



Figure 13: plagrel® 75mg (boite de 28 CP).

1.2 Réactifs

- ✓ Méthanol grade HPLC (Merck, Allemagne).Date de péremption 2015.
- ✓ Acétonitrile grade HPLC (Merck, Allemagne).Date de péremption 2016.
- ✓ Acide trifluoroacétique (Winlab, Ukraine).Date de péremption 2016.
- ✓ Eau distillée. Provenance (CRD)

1.3 Appareillages et instruments de mesure et de préparation des solutions

- ✓ **HPLCwaters [20]** couplé à un détecteur waters à barrette de diode **2998**, qui utilise un logiciel d'acquisition, de traitement et de gestion des données chromatographiques **Empower3 [21]**. Ce logiciel permet de gérer toutes les étapes de validation des méthodes chromatographiques, depuis la planification du protocole jusqu'à la création du rapport final, dans une même application.



Figure 14: HPLC water utilise équipé du logiciel Empower 3

- ✓ Balance analytique.
- ✓ Agitateur et barreau magnétique.
- ✓ Micro-Seringue pour HPLC.
- ✓ Filtre de 45 μ m.
- ✓ Poire à pipette.
- ✓ Mortier.
- ✓ Pilon.

1.4 Verreries

- ✓ Trois fioles jaugées de 50 ml.
- ✓ Deux béchers de 100ml.
- ✓ Pipete de 2ml.
- ✓ Éprouvettes de 100ml, 200ml et 500ml.

2 Méthodes

2.1 Préparation du diluant

Mélanger l'eau distillée (filtrée à l'aide d'un filtre 0,22 μ m) avec de l'acetonitrile grade HPLC avec des proportions en volume comme suit: 160/40 (v/v), en utilisant une éprouvette de 200ml.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Homogénéiser et dégazer le tout à l'aide d'un agitateur magnétique et d'un barreau aimanté.

2.2 Préparation des phases mobiles

2.2.1 Phase A

Contient 0.05 % d'acide trifluoroacétique dans l'eau distillée:

Préparation:

- ✓ Prélever 0.5ml d'acide trifluoroacétique à l'aide d'une pipette de 2ml.
- ✓ Introduire 0.5ml d'acide trifluoroacétique dans une éprouvette de 500ml qui contient 500ml d'eau distillée.
- ✓ Introduire un barreau magnétique.
- ✓ Agiter durant 2min à l'aide d'un agitateur magnétique.

2.2.2 Phase B

Contient 0.05 % d'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile.

Préparation:

- ✓ Prélever 0.5ml d'acide trifluoroacétique à l'aide d'une pipette de 2ml.
- ✓ Introduire 0.5ml d'acide trifluoroacétique dans une éprouvette de 500ml qui contient 500ml d'acétonitrile.
- ✓ Introduire un barreau magnétique.
- ✓ Agiter durant 2min à l'aide d'un agitateur magnétique.

2.3 Préparation du standard

- ✓ Peser à l'aide d'une balance analytique de précision **50 mg** du CLP bisulfate et les introduire dans une fiole jaugée de 50ml.
- ✓ Ajouter **2,5ml** de méthanol.
- ✓ Agiter durant **5** minutes.
- ✓ Introduire **25 ml** de diluant
- ✓ Compléter avec le diluant jusqu'au trait de jauge et homogénéiser le tout.
- ✓ A la fin, filtrer le tout à l'aide d'un filtre de **45µm**.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

2.4 Préparation de l'échantillon PLAVIX©

Détermination de la masse équivalente à 50mg en principe actif

- ✓ On pèse un ensemble de dix comprimés séparément à l'aide d'une balance analytique de précision.
- ✓ Puis on mentionne la masse individuelle de chaque comprimé
- ✓ Enfin, on détermine le poids moyen,

Les résultats sont mentionnés dans le tableau n°01.

Tableau06 : Masse des dix comprimés de PLAVIX©

N° du comprimé	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
masse (mg)	272,1	261,5	262,2	261,0	267,5	268,8	270,2	269,5	271,0	270,8

✚ Calcul du poids moyen:

Le poids moyen (PM) se calcule sur la somme des masses des dix (10) comprimés selon la relation suivante:

$$PM = M/10 \quad (1)$$

M : la somme des masses (m) des dix comprimés (égale à 2,675g)

$$PM = 0,2675 \text{ g}$$

✚ Calcul de la masse équivalente à 50mg en principe actif :

$$PM = 0,2675 \text{ g} \longrightarrow 75 \text{ mg}$$

$$m \longrightarrow 50 \text{ mg}$$

$$m = 0,1783 \text{ g}$$

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Protocole :

- ✓ A l'aide d'un mortier et d'un pilon, broyer dix comprimés.
- ✓ Peser à l'aide d'une balance analytique de précision **0,1783g** de PLAVIX® en poudre et les introduire dans une fiole jaugée de 50ml.
- ✓ Ajouter **2,5ml** de méthanol.
- ✓ Agiter durant **5** minutes.
- ✓ Introduire **25 ml** de diluant.
- ✓ Agiter à nouveau à l'aide d'un agitateur magnétique durant **30** minutes.
- ✓ Compléter avec le diluant jusqu'au trait de jauge et homogénéiser le tout.
- ✓ A la fin, filtrer le tout à l'aide d'un filtre de **45µm**.

2.5 Préparation de l'échantillon PLAGREL®

Évaluation de la masse équivalente à 50mg en principe actif

- ✓ Peser un ensemble de dix comprimés séparément à l'aide d'une balance analytique de précision.
- ✓ Mentionner la masse individuelle de chaque comprimé.
- ✓ Déterminer le poids moyen.

Les résultats de nos mesures sont mentionnés dans le tableau n°02

Tableau 07 : Masse des dix comprimés de PLAGREL®

N° du comprimé	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Masse (mg)	244,6	242,1	244,1	243,5	243,0	244,4	243,6	243,8	243,3	243,1

✚ Calcul du poids moyen

Le poids moyen se calcule sur la somme des masses des dix (**10**) comprimés à l'aide de l'équation (1).

$$M=2,436g$$

donc

$$PM=0,2436g.$$

✚ Calcul de la masse équivalente à 50mg en principe actif

$$PM=0,2436g \longrightarrow 75mg$$

$$m \longrightarrow 50mg$$

$$m=0,1624g.$$

✚ Protocole

- ✓ Peser à l'aide d'une balance analytique **de précision 0,1624g** de PLAVIX© en poudre et les introduire dans une fiole jaugée de 50ml.
- ✓ Ajouter **2,5ml** de méthanol.
- ✓ Agiter durant **5** minutes.
- ✓ Introduire **25 ml** de diluant.
- ✓ Agiter à nouveau à l'aide d'un agitateur magnétique durant **30** minutes.
- ✓ Compléter avec le diluant jusqu'au trait de jauge et homogénéiser le tout.
- ✓ A la fin, filtrer le tout à l'aide d'un filtre de **45µm** équipé d'une seringue.

2.6 Description de la méthode chromatographique

Ce travail expérimental est basé sur une méthode HPLC en phase inverse utilisant une colonne kromasil 100 pack C₁₈ ; 250mm ; diamètre intérieur 4.6mm ; diamètre des particules 5µ [18]. C'est une méthode gradient avec une phase mobile A (0.05% d'acide

Chapitre IV : Matériels et méthodes

trifluoroacétique dans l'eau) et une phase mobile B (0.05% d'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile).

Conditions opératoires

- ✓ Colonne C₁₈, 5μm (4.6 x 250) mm
- ✓ Le débit : 1ml/min.
- ✓ Détecteur UV à 220nm.
- ✓ Température : 45 °C.
- ✓ Temps : 35minutes.
- ✓ Volume d'injection : 10μl.
- ✓ Temps (min)/ A (v/v):B (v/v) T_{0,01}/80:20 T₂₅/50:50 T₂₆/80:20 T₃₅/80:20.



Figure 15: Colonne C₁₈ kromasil, 5μm (4.6 x 250) mm

Chapitre V : Résultats et Discussion.

1 Résultats

Les résultats des trois échantillons purs sont mentionnés dans les tableaux n°8,9 et 10 suivants (leurs chromatogrammes figurent dans l'**annexe 8**) :

Tableau 08 : Standard

	Tr	Surface	La surface en %	Hauteur
1	14.864	20613156	100.00	1089308

Tableau 09 : Plavix©

	Tr	Surface	Surface en %	Hauteur
1	14.471	20108066	100.00	1073362

Tableau 10 : plagrel®

	Tr	Surface	Surface en %	Hauteur
1	14.481	20774488	100.00	1116918

Les résultats des trois échantillons avec impuretés sont illustrés dans les tableaux n°11,12 et 13 suivants (leurs chromatogrammes figurent dans l'**annexe 8**) :

Chapitre V : Résultats et Discussion.

Tableau 11 : Standard avec impuretés

	tr	Surface	Surface en %	Hauteur
1	0.732	144524	0.49	7256
2	1.000	310061	1.04	9567
3	1.985	549550	1.85	16184
4	2.131	342194	1.15	19840
5	2.620	500299	1.69	27458
6	4.022	2603371	8.77	19736
7	5.792	597249	2.01	14675
8	6.523	555068	1.87	12080
9	7.375	626649	2.11	9122
10	9.065	101907	0.34	3912
11	9.508	25142	0.08	1547
12	10.402	15047	0.05	1155
13	10.903	13062	0.04	453
14	11.591	12467	0.04	753
15	12.198	6275	0.02	466
16	12.606	16795	0.06	901
17	13.062	3186	0.01	258
18	13.408	4189	0.01	342
19	14.864	20770619	69.97	1090435
20	17.238	18742	0.06	1910
21	17.805	124311	0.42	5859
22	18.815	578691	1.95	13076
23	19.305	439215	1.48	16943
24	19.972	792959	2.67	22938
25	20.338	532057	1.79	25496

Chapitre V : Résultats et Discussion.

Tableau 12 : Plavix© avec impuretés

	Tr	Surface	Surface en %	Hauteur
1	1.512	126607	0.39	8541
2	1.935	323087	1.00	16180
3	2.145	636841	1.97	27615
4	2.605	516210	1.60	38669
5	2.934	756784	2.35	50338
6	3.812	2194613	6.80	27602
7	4.577	337170	1.04	25001
8	4.805	334864	1.04	24151
9	5.040	675215	2.09	23256
10	5.550	675215	2.09	19813
11	6.140	663742	2.06	17348
12	7.043	418541	1.30	12907
13	7.428	279642	0.87	10681
14	8.162	224365	0.70	7694
15	8.457	90085	0.28	5406
16	8.778	79317	0.25	3600
17	9.393	19300	0.06	1529
18	11.073	36446	0.11	1316
19	11.537	10299	0.03	728
20	11.937	13950	0.04	458
21	13.158	7548	0.02	587
22	14.471	20229220	62.70	1074356
23	17.438	8298	0.03	381
24	18.257	9012	0.03	458
25	18.740	6697	0.02	326
26	19.220	3395	0.01	225
27	19.909	7495	0.02	473
28	20.382	39355	0.12	2974
29	21.338	15477	0.05	2347
30	21.975	209824	0.65	8786
31	22.705	540590	1.68	16428
32	23.572	1078358	3.34	25429
33	24.105	898586	2.78	30874
34	24.505	796592	2.47	35462
35	34.262	4800	0.01	561

Chapitre V : Résultats et Discussion.

Tableau 13 : Plagrel® avec impuretés

	tr	Surface	Surface en %	Hauteur
1	0.587	63046	0.23	4265
2	1.213	318364	1.17	12026
3	1.647	387628	1.42	17152
4	1.913	304947	1.12	20670
5	2.130	489183	1.79	29127
6	2.415	257938	0.95	25470
7	2.602	510652	1.87	39379
8	2.931	698710	2.56	45679
9	3.465	1807268	6.62	23005
10	4.640	562212	2.06	15573
11	5.423	173686	0.64	7551
12	6.057	41181	0.15	3795
13	7.467	15541	0.06	442
14	7.938	9368	0.03	930
15	8.185	43681	0.16	2383
16	8.730	23561	0.09	1358
17	9.411	49614	0.18	2276
18	10.046	19144	0.07	1044
19	10.483	26707	0.10	1591
20	10.940	16174	0.06	1188
21	12.216	24470	0.09	780
22	12.632	24023	0.09	1594
23	13.100	15379	0.06	972
24	14.481	21320412	78.12	1121377
25	15.668	12500	0.05	2082
26	17.437	10279	0.04	765
27	17.723	130	0.00	69
28	18.292	13887	0.05	431
29	19.438	10328	0.04	580
30	20.125	10137	0.04	472
31	20.968	13632	0.05	421
32	22.308	4	0.00	9
33	23.717	4525	0.02	242
34	24.002	5690	0.02	260
35	25.600	1	0.00	5
36	27.028	6617	0.02	485

Chapitre V : Résultats et Discussion.

Dans cette partie, nous allons effectuer une comparaison entre les résultats des trois échantillons, ensuite ces derniers seront comparés avec l'article pris comme référence, et pour finir, nous allons faire une autre étude comparative entre des articles publiés dans des journaux scientifiques ou dans des revues de recherche ainsi qu'avec les résultats de la méthode USP.

2 Interprétation

P. Aparna qui a publié l'article que nous avons choisi comme référence, a pu identifier les impuretés du CLP (illustrées dans les figures 16, 17, 18, 19 et 20) dans le produit fini par la méthode HPLC en phase PI utilisant une colonne achirale : Kromasil 100 C18, 250mm, diamètre intérieur 4.6mm, diamètre des particules 5 μ , en mode gradient avec une phase mobile A qui contient 0.1% d'acide trifluoroacétique dans l'eau et une phase mobile B qui contient 0.1% d'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile, avec une détection UV de 220nm, température de la colonne 45 °C pendant 35min. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 38 (**annexe 8**).

Impureté 1 :

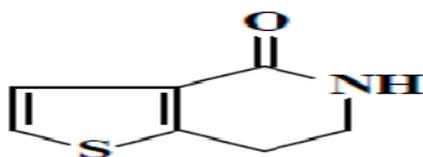


Figure 16: Dérivé de dihydro pyridinone (**impureté inconnue**)

Impureté 2 :

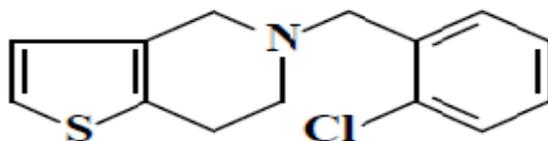


Figure17 : Clopidogrel décarbométhoxylaté (**impureté inconnue**)

Impureté connue :

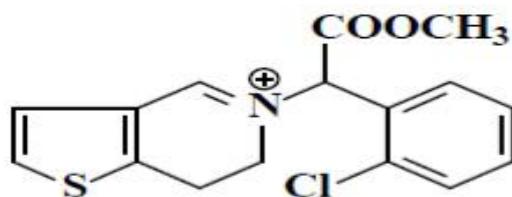


Figure18: Méthyl ester de dihydro pyridinone-2 (**impureté connue**)

Impureté A :

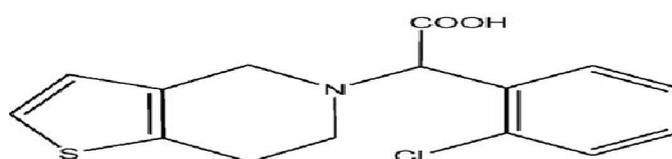


Figure 19 : impureté A.

Impureté B :

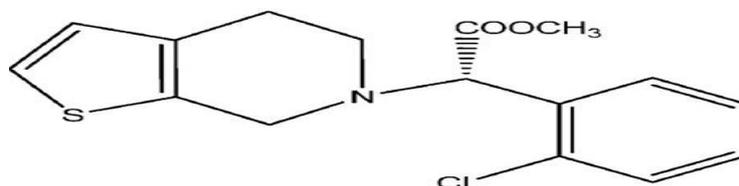


Figure 20: impureté B.

2.1 Identification du principe actif

1.1.1. Identification du principe actif dans l'échantillon plavix©

Comparaison avec l'article choisi comme référence.

Le temps de rétention du principe actif obtenu dans l'article est $T_R=16.414$ min, alors que dans l'échantillon plavix $T_R'=14.471$ min avec une surface : aire=62.70%.

La différence :

$$\Delta T_R = T_R - T_R' \quad \Delta T_R = 16.414 - 14.471 \quad \longrightarrow \quad \Delta T_R = 1.943.$$

Chapitre V : Résultats et Discussion.

2.1.1 Identification du principe actif dans l'échantillon plagrel®

Comparaison avec l'article choisi comme référence.

Le temps de rétention du principe actif obtenu dans l'échantillon plagrel® $T_R' = 14.481$ min avec une surface : **aire=78.12%**

La différence :

$$\Delta T_R = T_R - T_R' \quad \Delta T_R = 16.414 - 14.481$$

$$\Delta T_R = 1.933.$$

2.1.2 Identification du principe actif dans l'échantillon clopidogrel (API)

Comparaison avec l'article choisi comme référence.

Le temps de rétention du principe actif obtenu dans l'échantillon clopidogrel $T_R' = 14.864$ min avec une surface : **aire=69.97%**

La différence :

$$\Delta T_R = T_R - T_R' \quad \Delta T_R = 16.414 - 14.864$$

$$\Delta T_R = 1.574.$$

Remarque

- La différence qui réside entre le temps de rétention du principe actif obtenu dans l'article choisi comme référence et celui des trois échantillons analysés peut être due au temps mort des canaux entre la boucle d'injection et la colonne ou bien par rapport la performance de la colonne (neuve ou ancienne).
- Les temps de rétention du clopidogrel (principe actif) obtenus dans les trois échantillons sont très proches entre eux, de plus, le pourcentage des surfaces des pics étant très importants pour les trois échantillons.

Chapitre V : Résultats et Discussion.

2.2 Identification des impuretés

T_R : temps de rétention de l'impureté obtenu dans l'article choisi comme référence.

$$T_R' = T_R - \Delta T_R$$

ΔT_R : la différence entre le temps de rétention du principe actif obtenu dans la référence et celui obtenu dans chaque échantillon.

T_R'' : temps de rétention de l'impureté obtenu dans chaque échantillon.

%aire : la surface du pic de l'impureté obtenue dans chaque échantillon.

2.2.1 Impureté 1

Tableau 14 : Présence ou absence de l'impureté 1 dans les échantillons plavix© et plagrel®.

Impureté 1	T_R	ΔT_R	T_R'	T_R''	%aire
plavix	5.731	1.943	3.788	3.812	6.80
plagrel	5.731	1.933	3.798	3.465	6.62

D'après le tableau précédant, on remarque la présence de l'impureté 1 après 3 min dans les deux échantillons plavix© et plagrel®.

2.2.2 Impureté A

Tableau 15 : présence ou absence de l'impureté A dans les trois échantillons.

Impureté A	T_R	ΔT_R	T_R'	T_R''	%aire
plavix	9.198	1.943	7.255	7.428	0.87
plagrel	9.198	1.933	7.265	7.467	0.06
clopidogrel	9.198	1.574	7.624	7.375	2.11

D'après le tableau précédant, on remarque la présence de l'impureté A après 7 min dans les trois échantillons.

Chapitre V : Résultats et Discussion.

2.2.3 Impureté 2

Tableau 16 : Présence ou absence de l'impureté 2 dans les échantillons plavix© et plagrel®.

Impureté 2	T_R	ΔT_R	T_R'	T_R''	%aire
plavix	10.359	1.943	8.416	8.457	0.28
plagrel	10.359	1.933	8.426	8.185	0.16

D'après le tableau précédant, on remarque la présence de l'impureté 2 après 8 min dans les deux échantillons plavix© et plagrel®.

2.2.4 Impureté connue

Tableau 17 : présence ou absence de l'impureté connue dans les trois échantillons.

Impureté connue	T_R	ΔT_R	T_R'	T_R''	%aire
plavix	11.963	1.943	10.020	9.393	0.06
plagrel	11.963	1.933	10.030	10.046	0.07
clopidogrel	11.963	1.574	10.389	10.402	0.05

D'après le tableau précédant, on remarque la présence de l'impureté connue après 10 min dans les deux échantillons plavix© et plagrel®.

Chapitre V : Résultats et Discussion.

2.2.5 Impureté B

Tableau 18 : Présence ou absence de l'impureté B dans les trois échantillons.

Impureté B	T_R	ΔT_R	T_R'	T_R''	%aire
plavix	17.96	1.943	16.017	17.238	0.03
plagrel	17.96	1.933	16.027	15.668	0.05
clopidogrel	17.96	1.574	16.386	17.238	0.06

D'après le tableau précédant, on remarque la présence de l'impureté B après 16 min dans les trois échantillons.

2.2.6 Impuretés communes des trois échantillons

Tableau 19 : impuretés communes entre les trois échantillons.

	Impureté 1		Impureté2		Impureté3		Impureté4		Impureté5	
	T_R	%aire	T_R	%aire	T_R	%aire	T_R	%aire	T_R	%aire
Plavix	1.935	1.00	2.145	1.97	2.605	1.60	2.934	2.35	5.550	2.09
plagrel	1.913	1.12	2.130	1.79	2.620	1.69	2.931	2.56	5.792	2.09
clopidogrel	1.985	1.85	2.131	1.15	2.602	1.87	4.022	8.77	5.423	0.64

D'après le tableau précédant, on remarque l'apparence d'autres impuretés communes pour les trois échantillons.

Chapitre V : Résultats et Discussion.

2.2.7 Impuretés propres au plavix©

Tableau 20 : impuretés propres au plavix©.

Impuretés	T _R	% aire
1	22.705	1.68
2	23.572	3.34
3	24.105	2.78
4	24.505	2.47

Selon le tableau précédant, on remarque que l'échantillon plavix© présente d'autres impuretés.

1.1.2. Impuretés propres au CLP

Tableau 21 : impuretés propres au CLP.

Impuretés	T _R	% aire
1	18.805	1.95
2	19.305	1.48
3	19.972	2.67
4	20.338	1.79

D'après ce tableau, on remarque que l'échantillon standard présente d'autres impuretés.

Chapitre V : Résultats et Discussion.

2.3 Discussion

P. Aparna [13] a pu séparer les impuretés 1, 2, 3, A et B.

La méthode monographiée par l'USP, basée sur une méthode HPLC utilisant une colonne chirale Ultron ES-OVM (L57) avec une phase mobile solution tampon phosphate, une détection UV 220nm, un débit de 1ml/min, a identifié les impuretés : **A** (métabolite acide carboxylique) et **C** (énantiomère R du CLP illustré dans la figure 20) dans le produit fini et les impuretés **A**, **B** (stéréoisomères B₁ et B₂ du CLP) et **C** dans le produit pur.

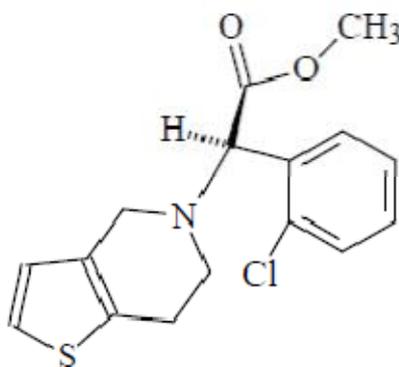


Figure 21 : Enantiomère R du CLP (impureté C).

D'après **P. Aparna [13]**, la méthode monographiée par l'USP n'est pas capable de séparer toutes les impuretés liées au CLP, cela est dû au fait que cette méthode est basée sur une PS chirale et que les impuretés ne sont probablement pas toutes chirales.

Selon **P. Aparna**, la génération des impuretés inconnues est probablement due au PEG, qui est présent dans le comprimé en tant que lubrifiant, après avoir effectué des études de compatibilités des excipients.

Dantu Durga Rao [22] dit que les colonnes chirales en PI ne sont pas capables de séparer toutes les impuretés.

Après avoir mis au point une méthode LC en PN avec une colonne chirale, pour l'identification du CLP et de ses impuretés, **Dantu Durga Rao** inclut une autre impureté E (figure 22).

Son objectif était de séparer les impuretés A, D, E seules avec la séparation de l'impureté B, l'énantiomère de l'impureté B et l'énantiomère du CLP (l'impureté C) du CLP.

Chapitre V : Résultats et Discussion.

Cette impureté D est identique à l'impureté 1 séparée par **P. Aparna**.

Il conclut que lorsqu'il y a lieu de séparer des impuretés chirales et non chirales, les phases stationnaires chirales, telles que la cellulose et l'amylose, sont les plus utilisées.

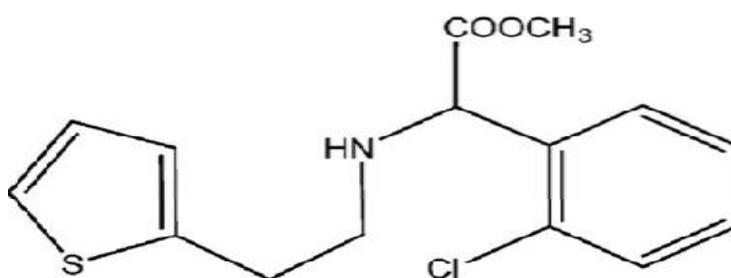


Figure 22 : Impureté E.

L'impureté 3 (connue) **méthyle ester de dihydro pyridinone-2** est identifiée par **Arivozhi Mohan [21]** en tant que principale impureté d'oxydation, après avoir effectué une étude de dégradation acide, basique, peroxyde et thermique sur le CLP pur et sur le produit fini (plavix®), ensuite ces échantillons sont analysés par une LC analytique avec une colonne C₈.

Il a trouvé 2 et 7% de l'impureté d'oxydation dans le CLP pur et dans plavix®, respectivement, dans des conditions d'oxydation. Dans les autres conditions, la formation de cette impureté n'est pas constatée. Ceci indique que la susceptibilité de dégradation est plus importante dans les comprimés plavix que dans le CLP pur.

Cette impureté est isolée par une LC préparative avec une colonne C₁₈ et caractérisée en utilisant des données analytiques obtenues à partir IR, UV, MS et RMN.

Le pourcentage de ces impuretés trouvé dans le CLP varie d'un produit à un autre selon sa composition qu'il soit produit pur ou produit fini (générique ou princeps), cela a été confirmé par **Y. Gomez[23]**, lorsqu'il a comparé 18 génériques du CLP avec 3 groupes de références (plavix) en se basant sur méthode HPLC avec une colonne chirale Ultron ES-OVM pour séparer l'énantiomère R du CLP et pour déterminer d'autres impuretés.

Il a constaté qu'un niveau élevé d'impuretés a été trouvé dans plusieurs génériques lors du test de pureté. Plus de 60% des génériques contiennent plus de quatre fois la quantité du produit

Chapitre V : Résultats et Discussion.

hydrolysé ou l'énantiomère R. Les excipients, la technologie de production et le conditionnement des échantillons sont aussi importants et peuvent avoir une influence sur la qualité des produits.

Il conclut que la plupart des génériques ne sont pas équivalents en terme de qualité par rapport aux produits de référence.

Une nouvelle méthode qui s'ajoute aux méthodes chromatographiques, l'électrophorèse capillaire (EC), plus particulièrement l'ECZ. Cette étude a été menée par **Ahmed S. Fayed [25]**, il a pu séparer les impuretés A, B et C du CLP, en utilisant un non revêtu capillaire en silice fondue. Quatre facteurs ont influé sur la séparation: concentration du tampon, pH.

Après une optimisation et des études de robustesse, le tampon utilisé est l'acide phosphorique triéthylamine 10mM, pH 2.3, et le sélecteur chiral choisi a été le β -cyclodextrine sulfaté 5% (m/v).

Conclusion générale

De nos jours, un nombre croissant de molécules pharmaceutiques, pour lesquelles la pureté énantiomérique doit être déterminée avant la poursuite de leur développement, incite l'industrie pharmaceutique à rechercher des méthodes d'analyse rapides et basées sur des protocoles simples à moindre coût et dans un bref délai.

Après avoir étudié de nombreux articles étudiant diverses méthodes d'analyse par [HPLC (PN et PI) ; CFS ; spectrophotométrie ; RMN ; MS ; IR], Afin de d'identifier le clopidogrel bisulfate et ses impuretés par une méthode simple et moins coûteuse, nous avons opté pour la méthode HPLC en phase inverse basée sur une colonne achirale.

Nous avons effectué une comparaison entre cette méthode et la méthode HPLC monographiée dans l'USP basée sur une colonne chirale.

A travers cette étude comparative et d'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que :

- ✓ La méthode basée sur une colonne achirale a donné des résultats fiables, elle a pu identifier les impuretés inconnues (dérivé de dihydro pyridinone et clopidogrel décarbméthoxylaté) du plagrel® et du plavix®. D'après la littérature, le polyéthylène glycol (PEG), utilisé comme excipient, étant responsable de la formation de ces impuretés.
- ✓ D'autres impuretés ont été identifiées dans les trois échantillons par cette colonne, le métabolite acide carboxylique (A), l'impureté d'oxydation (méthyle ester de dihydro pyridinone-2).
- ✓ Cette méthode n'est pas capable de séparer des impuretés chirales. Nous avons obtenu un seul pic pour l'impureté B (stéréoisomères B₁ et B₂ du clopidogrel) et pour le clopidogrel.
- ✓ L'impureté C (énantiomère R du clopidogrel) est incluse dans le pic du clopidogrel.

Perspectives

La validation de cette méthode est obligatoire pour pouvoir remplacer la méthode HPLC basée sur une colonne chirale.

On peut prévoir une autre méthode complémentaire des méthodes chromatographiques qui est l'électrophorèse capillaire (EC). Son succès repose sur la simplicité du mode de séparation qui est basée sur la formation de complexes diastéréoisomères. Le coût d'une analyse en EC est moindre qu'en HPLC (absence de colonne chirale onéreuse et de solvant, faible consommation de sélecteur chiral, grandes efficacités des pics et mécanisme de séparation simple à prévoir).

Références bibliographiques

- [1] **Haroun, M.** (2007, Mai 23). Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés. Grenoble, France.
- [2] **C. Gros, G. B.** (1995). l'actualité chimique, le monde de la chiralité., (pp. 09-15). Dijon.
- [3] **Reddy, I. K.** (2004). chirality in drug design and development (Vol. 90). Texas: Marcel Dekker.
- [4] **Hassan Y. aboul-Encin, K. F.** (2003). chiral separations by liquid chromatography and related technologies (Vol. 90). Marcel Dakker.
- [5] **Cordier, c.** (2007). chiralité., (pp. 1-16).
- [6] **Cordier, c.** (2009). chiralité et énantiomère., (pp. 1-12).
- [7] **Wilem, S. H.** (1996). stéréochimie des composés organiques. lavoisier Iec& doc.
- [8] aclg.ulg. (s.d.). propriétés de énantiomères . Consulté le mars 10, 2013, sur isomerie_CG.doc: www.aclg.ulg.be/Create/isomerie_CG/page_12.htm
- [9] sanofi aventis . (2013). monographie clp. Québec.
- [10] Ind.swift . (2010). control qualité.
- [11] vidal. (2011). plavix.
- [12] sanofi aventis. plavix., (pp. 1-59).
- [13] **P. Aparna, S. V.** (2010). non chiral high performance liquid chromatography method for monitoring unknown impurities during stability of clopidogrel tablets. Scholars Research Library , 2, 244-252.
- [14] **Alarfaj, N. A.** (2010). Stability-indicating liquid chromatography for determination of clopidogrel bisulfate in tablets: Application to content uniformity testing. Journal of Saudi Chemical Society , 16, 23-30.
- [15] **Skoog-West-holler, d. A.** (2003). chimie analytique (éd. 7). De Boeck.
- [16] **Gwenola Burgot, J.-L. B.** méthodes instrumentales d'analyses chimie et applications (éd. 3). lavoisier.
- [17] **Pianava, I.** (2006). Les techniques Chromatographiques orientées sur les matériaux composites -Lionel panaiva., (p. 3).
- [18] water. HPLC water.

Références bibliographiques

[19] waters. Empower 3.

[20] EL KENDI. (s.d.). plagrel 75mg.

[21] **Arivozhi Mohan, M. H.** (2007). Identification and characterization of a principal oxidation impurity in clopidogrel drug substance and drug product. *science direct* , 47, 183-189.

[22] **Dantu Durga Rao, L. K.** (2010). A validated stability-indicating normal phase LC method for clopidogrel bisulfate and its impurities in bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 52, 160-165.

[23] **Y. Gomez, E. A.** (2004). Analysis of purity in 19 drug product tablets containing clopidogrel: 18 copies versus the original brand. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 34, 341-348.

[24] **Pravin B. Cholke, R. A.** (2012). Development and Validation of Spectrophotometric Method for Clopidogrel bisulfate in pure and in film coated tablet dosage form. *Scholars Research Library* , 4, 59-64.

[25] **Ahmed S. Fayed, Soheir A.Weshahy** (2009). Separation and determination of clopidogrel and its impurities by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49 193–200.

[26] Nadia Boulekras, Stéréochimie-chimie organique, nadia-boulekras.e-monsite.com/medias/files/4-stereochimie-1.pdf consulté le 15 septembre 2013

[27] Pharmacopée européenne 7.0 ; 2.2.29 chromatographie liquide (2011).

[28] <http://chemphys.ustrasbg.fr/mpb> consulté le 1/07/2013

Glossaire

ADP : adénosine diphosphate est un nucléotide. C'est un ester de l'acide phosphorique et du nucléoside adénosine. Il est constitué d'un pyrophosphate, d'un sucre pentose, ribose et de la nucléobase adénine de formule chimique $C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$.

Asymétrique : absence de tout élément de symétrie (une structure asymétrique est chirale).

Chromatogramme : c'est un graphique utilisé en analyse qualitative et quantitative. Il présente en abscisse, le temps ou le volume d'élution et en ordonnée, le signal du détecteur qui est fonction de la concentration du constituant à la sortie de la colonne. Les positions des pics sur l'axe du temps permettent d'identifier les constituants du mélange (analyse qualitative) tandis que les aires sous les pics mesurent leur quantité.

Composé amorphe: est un composé dans lequel les atomes ne respectent aucun ordre à moyenne et grande distance, ce qui le distingue des composés cristallisés. Les verres, les élastomères et les liquides sont des composés amorphes.

Détecteurs spécifiques : sensibles qu'à certains produits.

Détecteurs universels : sensibles pratiquement à tous les composés élués.

Dédoublément : opération permettant d'isoler un énantiomère à partir d'un mélange racémique.

Distomère (D) : représente l'énantiomère dont l'activité biologique est la moins forte ou dont l'affinité relative de liaison à récepteur biologique ou une enzyme est la plus faible, voire nulle.

Elution : C'est l'entraînement d'un soluté à travers une colonne par une phase mobile appropriée. Elle consiste à introduire le mélange au sommet de la colonne qui est entraîné par la suite à l'aide d'un éluant.

Eutomère (E) : définit l'énantiomère dont l'activité biologique est la plus forte ou dont l'affinité relative de liaison à un récepteur biologique ou une enzyme est la meilleure.

Glossaire

Fluide supercritique : substance qui est maintenue au-dessus de sa température critique ; ses propriétés sont intermédiaires entre celles d'un liquide et celles d'un gaz.

Gel d'agarose : L'agarose est un polymère à base d'agar purifié

Gel de silice c'est la phase stationnaire la plus utilisée en chromatographie et notamment en HPLC. Il est constitué de micro sphères de diamètre sensiblement constant pouvant varier de 2 à 5 μm . Il est très polaire. Avec un éluant apolaire, les solutés polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux solutés apolaires qui sortent en premier.

La surface des micro sphères de silice comporte des groupements silanol : $\text{Si} - \text{OH}$ qui sont essentiels au phénomène d'adsorption en particulier parce qu'ils permettent la formation de liaisons hydrogène et sont responsables de la polarité et de l'acidité de la silice. Ces groupements silanol s'ils sont trop nombreux entraînent de trop importantes adsorption et leur nombre doit être soigneusement contrôlé.

Pour de nombreuses applications on préfère désactiver une partie de ces sites par hydratation, l'eau est alors prioritairement adsorbée.

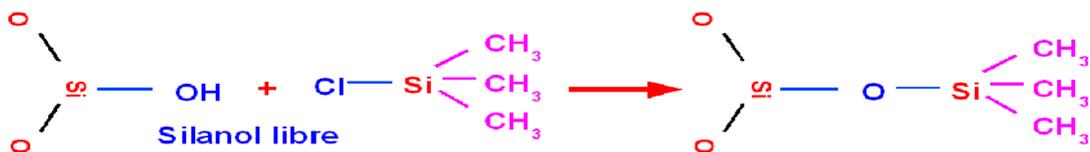
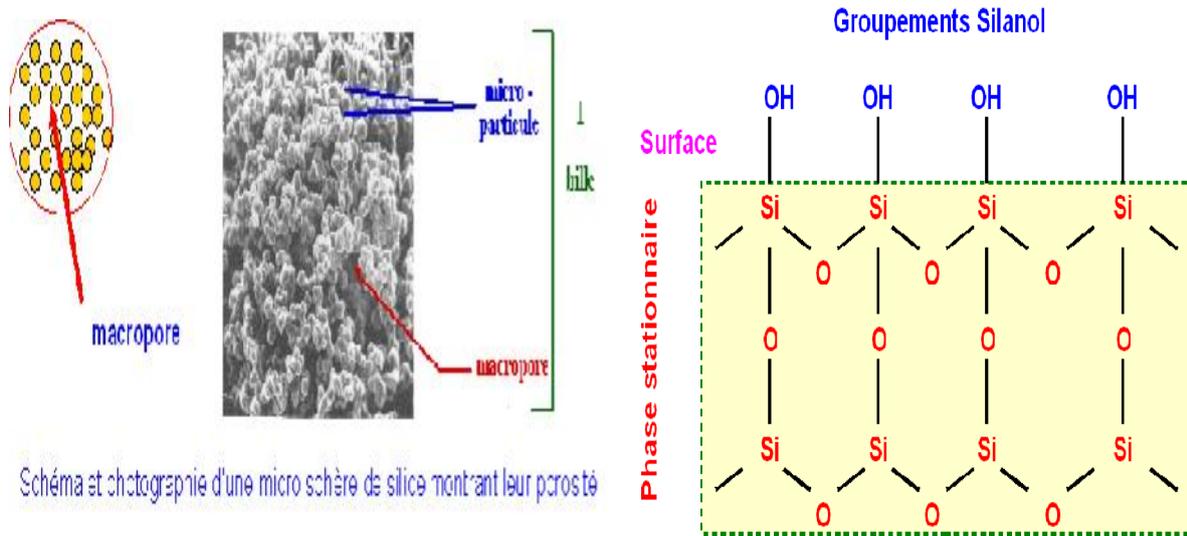
Avec les particules de faible diamètre, $d \sim 2 \mu\text{m}$, la surface de contact augmente, la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) diminue et l'efficacité de la colonne augmente.

En chromatographie en phase inverse, ils sont très gênants car ils sont très polaires et ont donc une grande affinité avec les solutés polaires, et vont donc les retarder énormément.

On doit donc les éliminer au maximum en phase inverse.

On utilise un procédé nommé "end capping" qui consiste à retraiter la phase greffée par un silane porteur de groupements méthyle. Une grande partie des groupements silanols est alors éliminée.

Glossaire



Procédé dit "end capping" : élimination des silanols libre pour la chromatographie en phase inverse

Liaisons non covalentes :

Les quatre principaux types de liaisons non covalentes sont :

- liaison ionique : interaction électrostatique entre ions qui est considérée comme forte.
- liaison hydrogène : c'est une liaison de faible intensité qui relie les molécules. Elle implique un atome d'hydrogène et un atome assez électronégatif (comme l'oxygène par exemple).
- les forces de Van der Waals: interactions de faible intensité entre atomes, molécules, ou une molécule et un cristal. Elles sont dues aux interactions entre les moments dipolaires électriques des deux atomes mis en jeu.
Aucun électron n'est mis en commun entre les deux atomes.
- les liaisons hydrophobes : les molécules dont le radical est hydrophobe et apolaire (aliphatiques, aromatiques) ont la propriété d'empêcher la formation de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau.

Glossaire

Lois de BEER et LAMBERT :

$$I = I_0 e^{-\varepsilon l C}$$

Ou encore :

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

$$T = I/I_0,$$

I_0 : Intensité du rayonnement monochromatique incident,

I : Intensité du rayonnement monochromatique transmis.

C : Concentration molaire de l'entité absorbante dans la solution (mol.l^{-1})

ε : Coefficient d'absorption molaire de la substance en solution (l/mol.cm) à λ considérée.

l : Longueur du trajet optique (en cm), qui correspond à l'épaisseur de la cuve de mesure.

T : La transmittance d'une solution est la fraction du rayonnement électromagnétique incident qui est transmis par un échantillon.

Absorbance : L'absorbance augmente lorsque l'atténuation du faisceau augmente (la transmittance diminue).

Mélange racémique : mélange équimolaire des deux énantiomères.

Métastabilité: est la propriété pour un état d'être stable cinétiquement mais pas thermodynamiquement. La vitesse de la transformation menant à l'état stable est relativement lente, voire quasi-nulle. Si on considère un système physico-chimique représenté par son énergie potentielle, un état métastable sera caractérisé par un état qui correspond à un minimum local d'énergie. Pour que le système puisse atteindre l'état du minimum absolu de l'énergie correspondant à l'état d'équilibre thermodynamique, il faut lui fournir une quantité d'énergie appelée Énergie d'activation.

Phase mobile mobile : est une phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant l'analyte avec elle.

Glossaire

Phase stationnaire : est une phase qui reste en place soit dans une colonne soit sur une surface plane.

Résolution d'une colonne : mesure de l'aptitude d'une colonne chromatographique à séparer deux analytes.

Solution tampon : solution qui atténue les variations de P^H résultant de la dilution ou de l'addition de petites quantités d'acide ou de base.

Température critique : d'une substance est la température au dessus de laquelle elle ne présente plus de phase liquide distincte.

Temps de demi-vie : est le temps mis par une substance (molécule, médicament ou autres) pour perdre la moitié de son activité pharmacologique ou physiologique.

Annexe

Annexe 1 : Isomérisation de constitution [26]

On appelle **isomères de constitution**, deux molécules qui possèdent la même formule brute mais ont des formules développées planes différentes. Les **isomères** ont des propriétés physiques, chimiques et biologiques différentes. On distingue trois types d'isomérisation :

a) **Isomérisation de fonction** : les isomères de fonction ont des groupements fonctionnels différents :

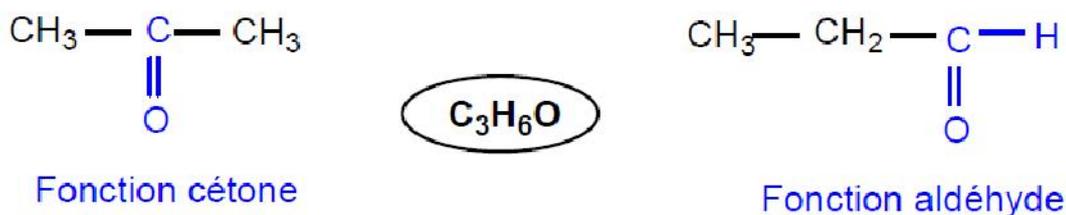


Figure 23: Isomères du C₃H₆O.

b) **Isomérisation de position** : les isomères de position ont la même fonction, mais le groupement fonctionnel ou une insaturation (une double liaison entre deux carbones) est porté par des carbones différents de la chaîne carbonée :

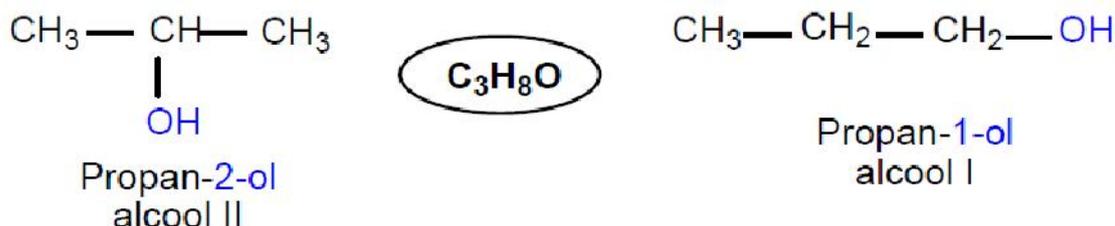


Figure 24 : Isomères du C₃H₈O.

c) **Isomérisation de squelette ou de chaîne** : L'enchaînement des atomes sur le squelette carbone est différent :

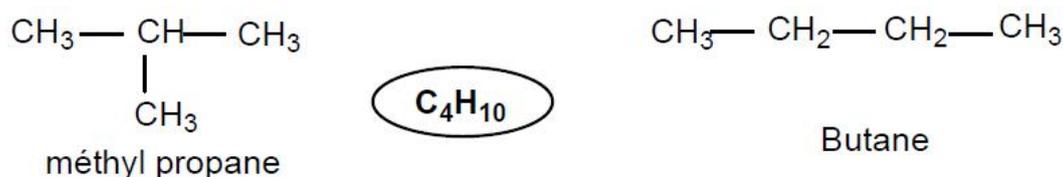


Figure 25 : Isomères du C₄H₁₀

Annexe

Annexe 2 : Activité optique [26]

La plupart des énantiomères possèdent des propriétés physicochimiques identiques, à l'exception de leur pouvoir rotatoire.

Deux énantiomères purs font dévier le plan de la lumière polarisée d'une valeur égale mais en sens opposé. On dit que ces molécules sont optiquement actives ou douées de pouvoir rotatoire :

- L'énantiomère faisant tourner le plan de polarisation de la lumière vers la droite est dit dextrogyre, note (**d**) ou (+); (« *qui tourne à droite* », en latin *dextro* : droite).
- Celui faisant tourner le plan vers la gauche est dit lévogyre, note (**l**) ou (-); (« *qui tourne à gauche* », en latin *laevus* : gauche.).
- Un **mélange racémique** est optiquement inactif car il contient les deux énantiomères en quantité équimolaire et a un pouvoir rotatoire nul. Le "racémique" est note (\pm).

Expérience :

Quand une substance optiquement active est traversée par un faisceau de lumière polarisée, elle provoque une rotation du plan de polarisation de cette lumière d'un angle α qu'on peut mesurer expérimentalement grâce à un polarimètre.

Le polarimètre est un appareil qui utilise la lumière dite polarisée (lumière qui n'évolue que dans un plan, appelé le plan de polarisation). Il est constitué d'une cuve de longueur l , remplie d'une solution d'un énantiomère à la concentration C :

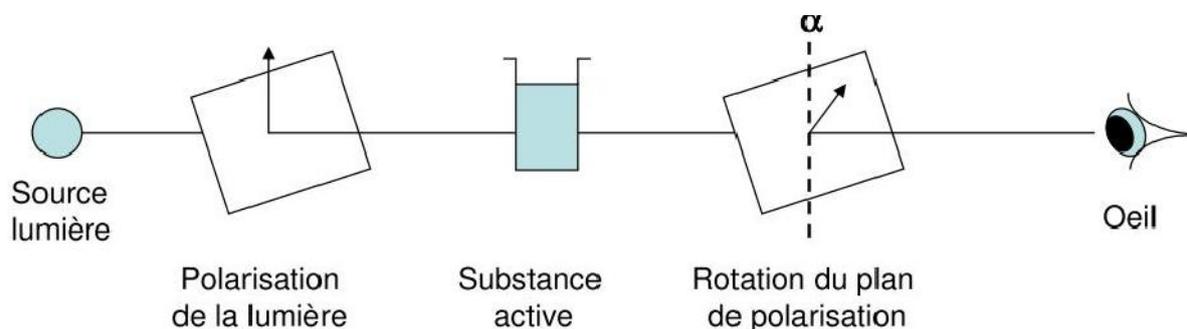


Figure 26 : Pouvoir rotatoire

Annexe

α est proportionnel à la longueur de la cuve contenant la substance optiquement active et à la concentration de la solution.

α dépend également du solvant, de la longueur d'onde de la lumière et de la température.

Pour chacun des 2 énantiomères d'une molécule chirale, on définit un *pouvoir rotatoire spécifique* $[\alpha]_{\lambda}^t$ donné par la loi de BIOT :

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

α : angle de rotation optique observée (en degrés)

l : longueur de la cuve contenant la solution (en dm).

c : concentration de la solution (en g/ml).

t : température (°C)

l : longueur d'onde de la lumière incidente.

Annexe 3 : Diastéréoisomérisation [26]

a) Isomérisation géométrique des éthyléniques :

La présence d'une double liaison C=C (éthylénique), C=N (imine...)

ou N=N (diazonium) empêche la rotation des deux atomes l'un par rapport à l'autre. Par conséquent, si chacun de ces deux atomes porte 2 groupements différents, il peut exister deux configurations distinctes appelées stéréoisomères géométriques ou diastéréoisomères de type Z/E.

Pour les nommer, on utilise les règles (**C.I.P**) qui permettent de classer les groupements sur chaque carbone :

- si les deux groupements prioritaires **a** et **a'** sont du même côté de l'axe de la double liaison, il s'agit de l'isomère **Z** (de l'allemand Zusammen qui signifie ensemble).
- si **a** et **a'** sont de part et d'autre de la double liaison, il s'agit de l'isomère **E** (de Entgegen qui signifie opposé).

Annexe

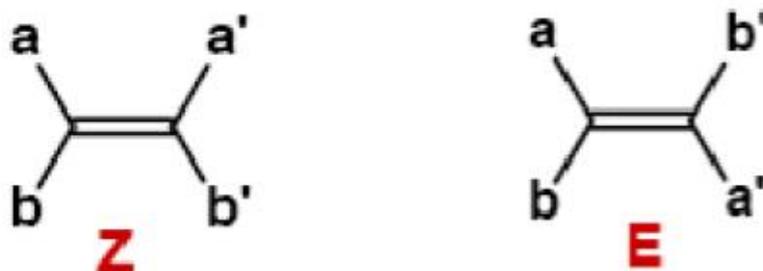


Figure 29 : Stéréoisomères géométriques de type Z et E.

b) Isomérisation cyclique Cis/Trans :

La diastéréoisomérisation cis-trans est utilisée dans les composés cycliques qui portent deux substituants R identiques.

Elle repose sur la position relative des deux substituants :

- si les 2 substituants se trouvent du même côté d'un plan défini par le cycle ; il s'agit de l'isomère " **Cis**".
- Si les 2 substituants se trouvent de part et d'autre du plan du cycle ; c'est l'isomère " **Trans**".

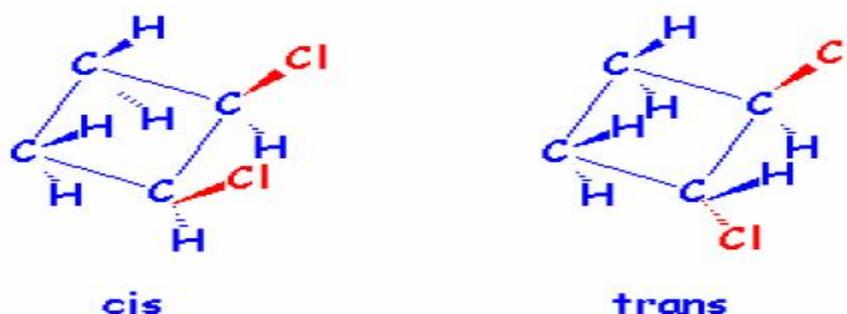


Figure 30 : Stéréoisomères cycliques cis/trans.

c) Molécules comportant plusieurs C* :

La diastéréoisomérisation est due à la présence de 2 (ou plus) C* dans une molécule. De telles molécules sont fréquentes dans la nature et notamment dans les composés naturels: sucres, acides aminés...

Une molécule contenant **plus d'un carbone asymétrique** n'est **pas nécessairement chirale**. Pour une structure donnée, il n'existe qu'une molécule image dans un miroir ; les autres structures possibles sont des diastéréoisomères.

Annexe

Annexe 4: isomérisie de conformation [26]

Les conformations de l'éthane : $\text{CH}_3\text{-CH}_3$

Les deux structures de l'éthane (décalée et éclipsée) représentées ci-dessous se déduisent l'une de l'autre par rotation, d'un angle α , autour de l'axe de la liaison C-C. L'expérience montre qu'à température ordinaire, ces deux structures ne sont pas séparables car la même molécule se présente successivement sous une infinité de conformations :

- l'éthane **éclipsé**, conformation la **moins stable** (énergie potentielle maximale)
- l'éthane **décalé**, conformation la **plus stable** (énergie potentielle minimale).

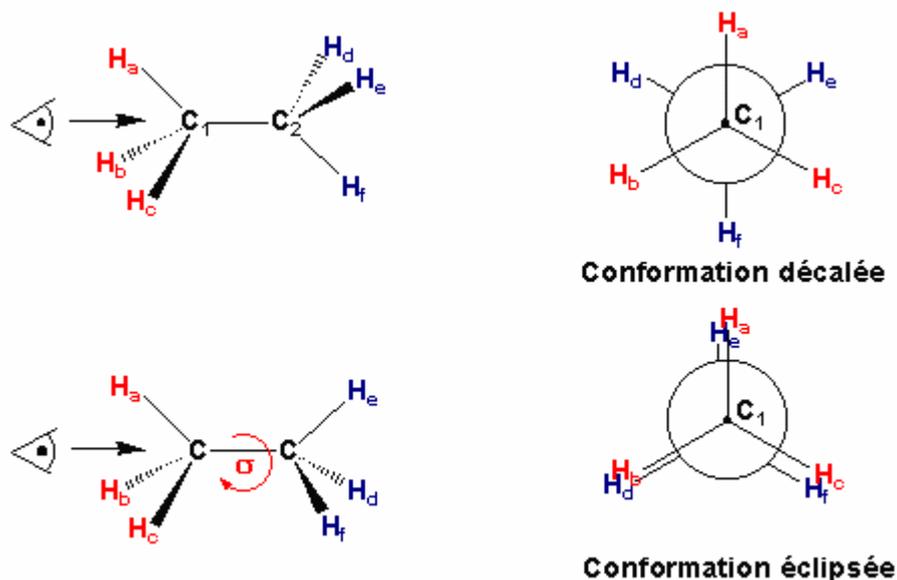


Figure 27: Conformation de l'éthane

Les conformations du cyclohexane : C_6H_{12}

Le cyclohexane est un hydrocarbure cyclique saturé de formule brute C_6H_{12} . La rotation autour des axes C-C permet d'adopter une infinité de conformations (respectant les longueurs de liaison et approximativement les angles valenciels). Cependant, deux conformations remarquables sont obtenues pour le cyclohexane, il s'agit des formes appelées "chaise" et "bateau", la forme chaise est plus stable:

Annexe

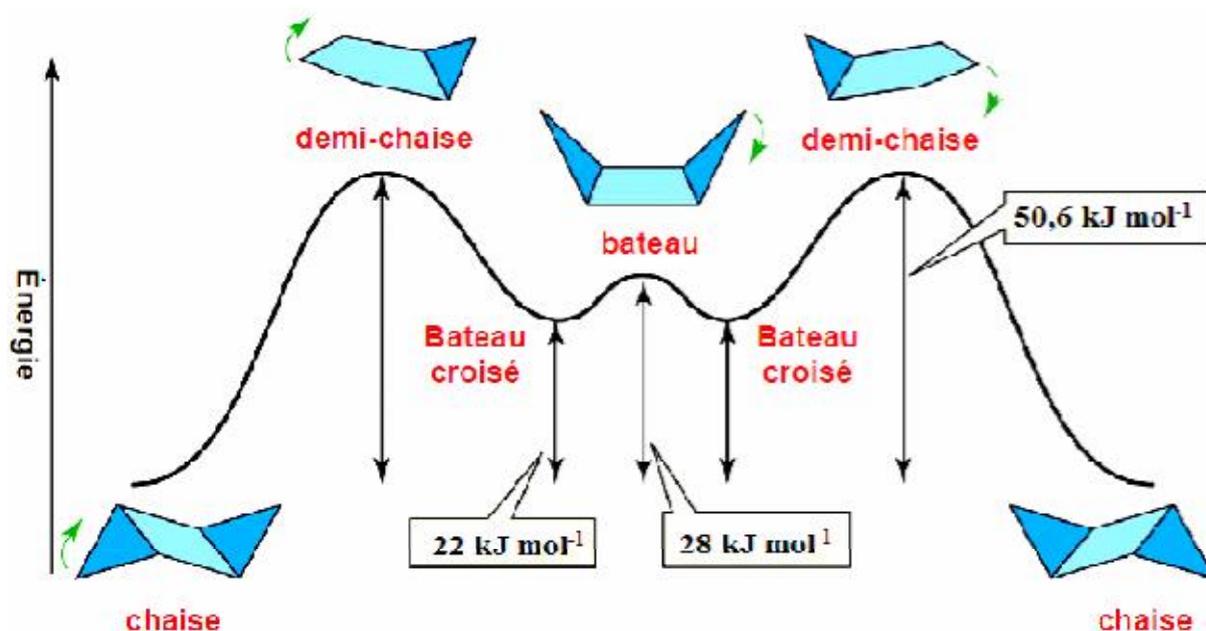


Figure 28: Diagramme énergétique du cyclohexane

Annexe 5 : Classification de la chromatographie selon les phénomènes mis en jeu [18], [19], [20]

Chromatographie d'adsorption ou liquide-solide : les phases stationnaires utilisées sont la silice et l'alumine. Le seul paramètre qui contrôle les coefficients de distribution des analytes est la composition de la phase mobile. Le changement de solvant entraîne des variations dans le temps de rétention et donc dans la résolution. Elle est utilisée pour séparer des composés organiques non polaires, insolubles dans l'eau.

Chromatographie d'exclusion : c'est la méthode de chromatographie liquide la plus récente. Contrairement aux autres méthodes chromatographiques, celle-ci est pratiquement indépendante de la nature du solvant. Le principe est donc simple : la séparation des molécules de tailles différentes est basée sur leur possibilité de pénétrer ou de ne pas pénétrer à l'intérieur de la phase stationnaire.

- La chromatographie par perméation de gel: la phase mobile est une phase organique.

Annexe

- La chromatographie par filtration de gel : la phase mobile est une phase aqueuse.

Chromatographie de partage ou liquide-liquide : basée sur la différence de solubilité d'un soluté entre deux liquides non miscibles. On peut distinguer de types selon la polarité des phases mobile et stationnaire :

Chromatographie en phase normale (phase stationnaire très polaire et la phase mobile relativement non polaire) : les constituants peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile, ils sont alors élués plus rapidement, inversement les constituants peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et donc migrent lentement, tandis que la chromatographie en mode inversé (phase stationnaire non polaire et la phase mobile est relativement polaire, dans ce cas le constituant le plus polaire est le premier à être entraîné.

Chromatographie par échange d'ions : les phases stationnaires utilisées sont des résines échangeuses d'ions, où des ions de même signe sont séparés par élution sur une colonne remplie d'une résine finement divisée.

Annexe 6 : Résolution [27]

La résolution est définie comme étant l'aptitude de la colonne à séparer deux solutés (1 et 2) donnant des pics voisins. Elle peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{h1} + W_{h2})}$$

t_{R1} , t_{R2} : temps de rétention des pics, $t_{R2} > t_{R1}$

w_{h1} , w_{h2} : largeur des pics à mi-haut.

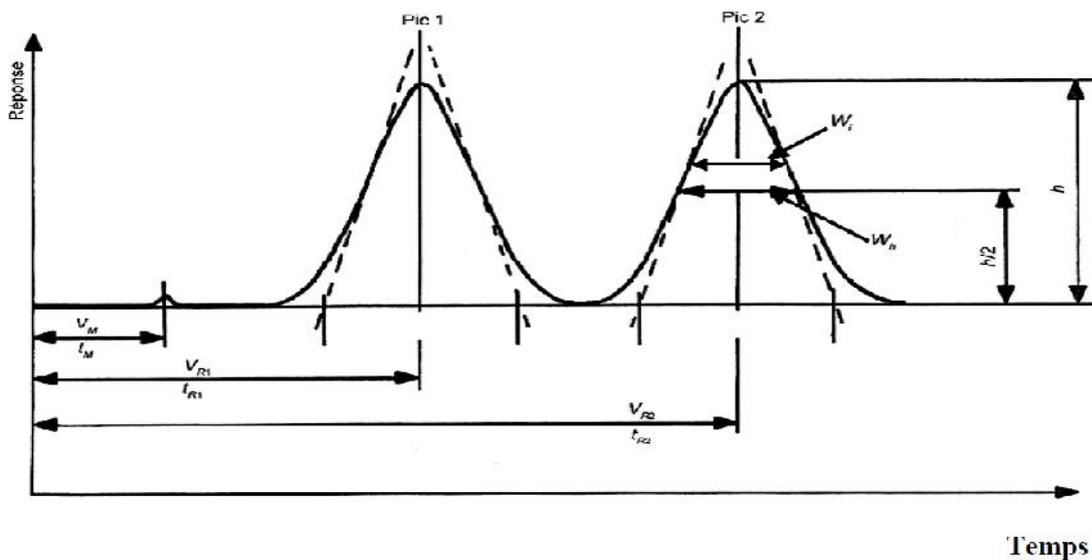


Figure31 : Chromatogramme typique [27]

Annexe 7 : efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne s'évalue à partir de l'un des termes suivants H ; Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT) et N : Nombre de plateaux théoriques

Nombre de plateaux théorique N [32]

Le nombre de plateaux dépend de la nature de l'analyte, de la colonne et de sa température, de la nature de la phase mobile et du temps de rétention des analytes.

Le nombre de plateaux théoriques N est donné par la relation suivante :

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

N : nombre de plateaux théoriques

t_R : temps de rétention du pic correspondant au composant considéré

W_h : largeur du pic à mi-hauteur.

Annexe

Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT ou H) [28]

Ce paramètre est calculé pour des composés de référence car il permet de comparer des colonnes de longueurs différentes, bien qu'il ne s'agisse en aucune façon d'une constante. Sa valeur dépend du composé choisi et des conditions de l'expérience.

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) est donnée par la relation suivante :

$$\mathbf{H} = \frac{\mathbf{L}}{\mathbf{N}}$$

L : longueur de la colonne, N : nombre de plateau théorique.

Annexe

Annexe 8 : chromatogrammes obtenus pour chaque échantillon

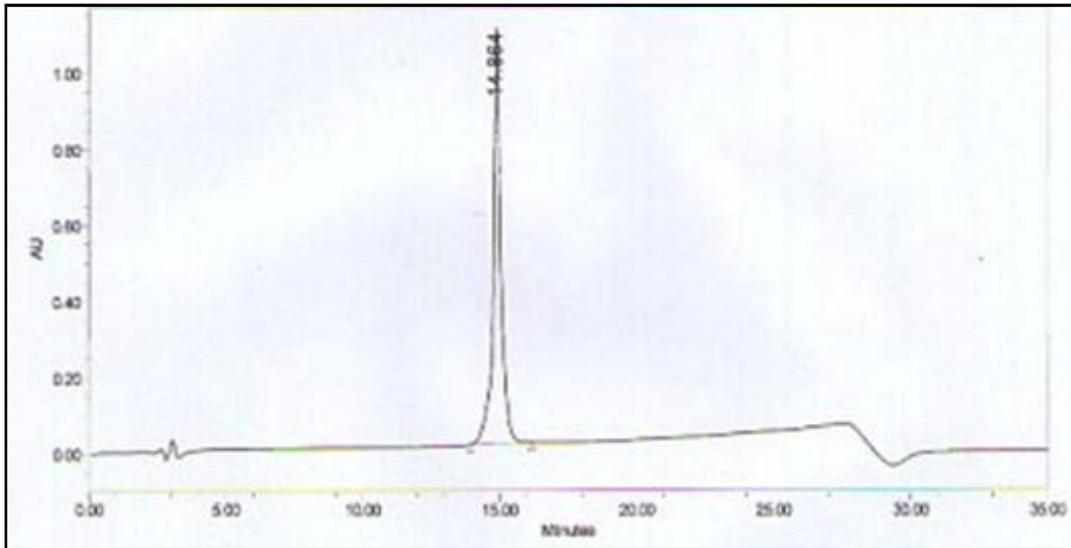


Figure 32: Chromatogramme du standard.

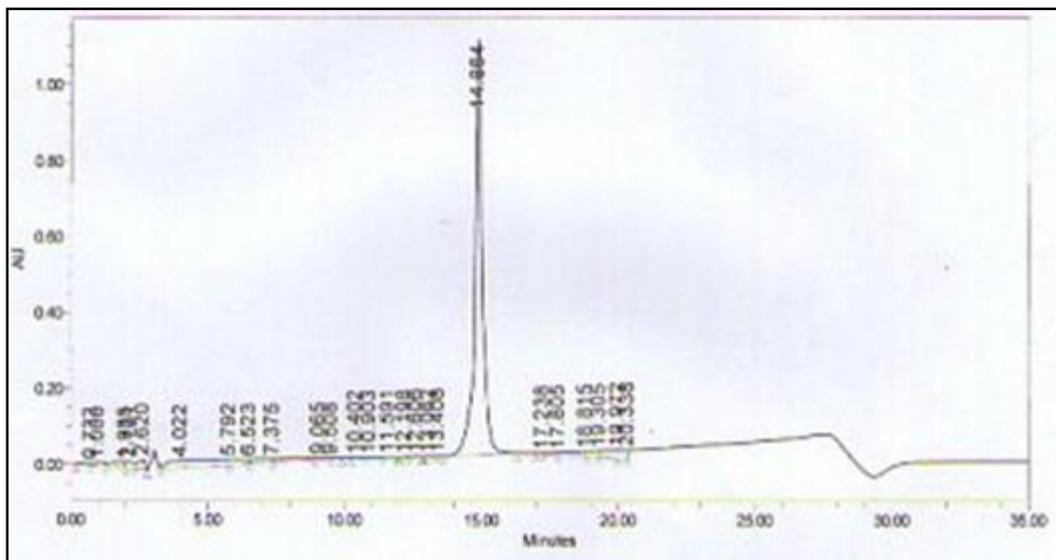


Figure 33 : Chromatogramme du standard et de ses impuretés.

Annexe

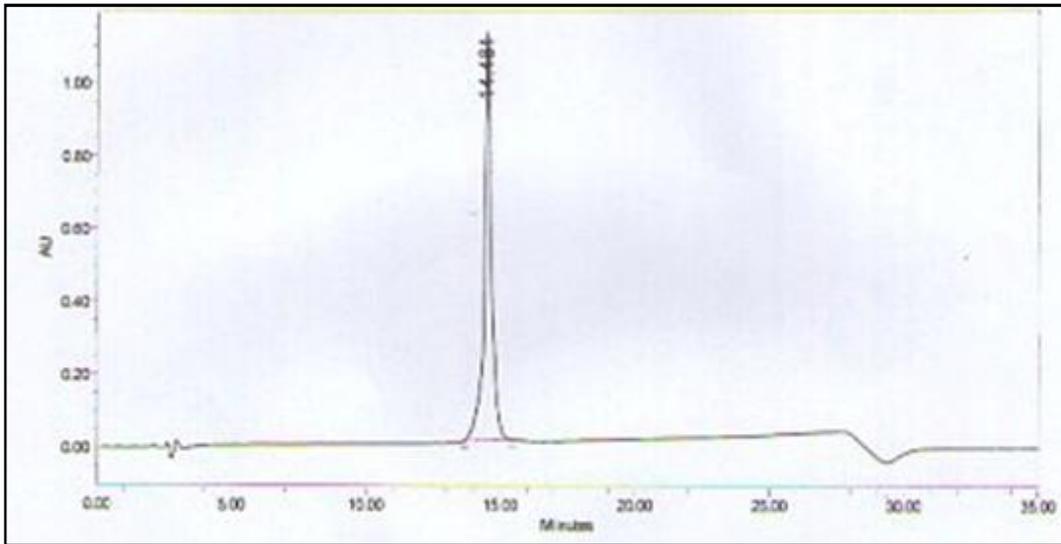


Figure 36 : Chromatogramme du plagrel®.

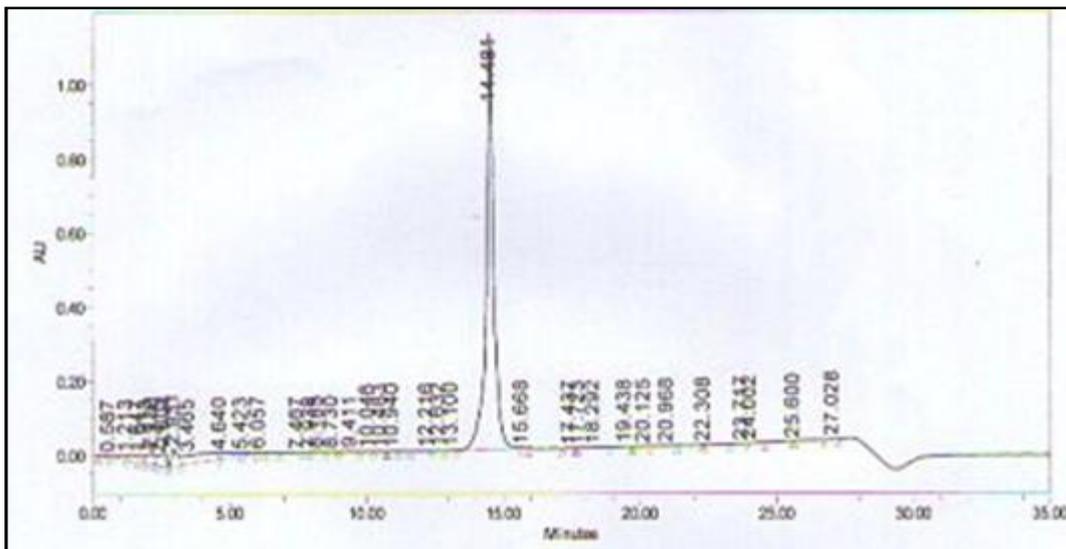


Figure 37 : Chromatogramme du plagrel® et de ses impuretés.

Annexe

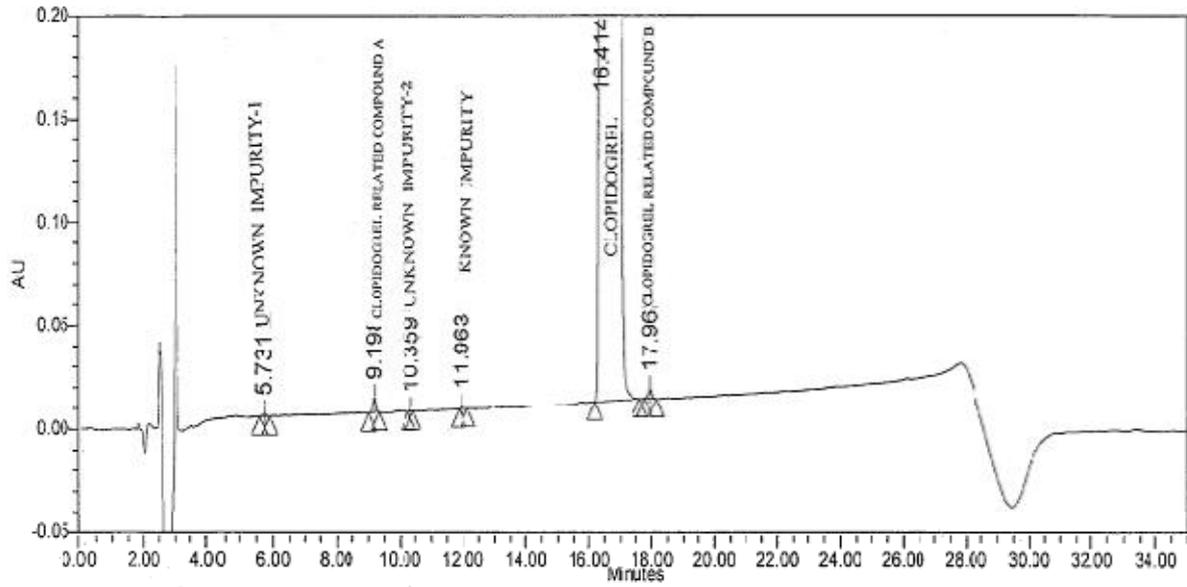


Figure 38 : Chromatogramme du CLP obtenu dans l'article de référence.